

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Podbielski

***In vitro*- Analysen des Adhärenz- und
Internalisierungsverhaltens von Gruppe-A-
Streptokokken an murine Makrophagen und humane
Monozyten**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock



vorgelegt von

Bianka Skupin, geboren am 27.01.1981 in Grevesmühlen

aus Halle/Saale

Rostock, 17.09.2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0016-5

Dekan: Prof. Dr. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski, Direktor am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Medizinische Fakultät der Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt, Leiter der Abteilung Genetik der Mikroorganismen, Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Greifswald
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Saleh Ibrahim, Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Universität zu Lübeck

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Bakteriologische und serologische Einordnung von <i>S. pyogenes</i>	1
1.2	Klinische Bedeutung von <i>S. pyogenes</i>	2
1.2.1	Vorkommen.....	2
1.2.2	Typische durch <i>S. pyogenes</i> hervorgerufene Krankheitsbilder	2
1.2.3	Prädisponierende Faktoren und Epidemiologie der Infektionen	4
1.3	Wichtige Virulenzfaktoren von <i>S. pyogenes</i>	5
1.3.1	M-Protein	5
1.3.2	Weitere Adhäsine	6
1.3.3	Pyrogene Exotoxine	7
1.3.4	Weitere Virulenzfaktoren	7
1.4	Adhäsion und Invasion von eukaryoten Zellen.....	8
1.5	Rolle der Invasion im natürlichen Infektionsprozess der GAS	10
1.6	Regulation der Expression der Virulenzfaktoren durch das FasBCAX-System.....	11
1.7	Monozyten/Makrophagen	12
1.7.1	Funktion	12
1.7.2	Effektormechanismen.....	13
1.8	Aufgabenstellung.....	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Verwendete Bakterienstämme und Immunzellen.....	16
2.1.1	Bakterien.....	16
2.1.2	Eukaryote Zelllinien	17
2.2	Kulturmedien.....	17
2.2.1	Kulturmedien für Gruppe-A-Streptokokken.....	17
2.2.2	Kulturmedien für eukaryote Zellen.....	18
2.3	Chemikalien, Kits, Puffer	19
2.4	Laborgeräteausstattung	21
2.5	Stammhaltung und Kultivierung der Zellen	21

2.5.1	Gruppe-A-Streptokokken.....	21
2.5.2	Kultivierung der Immunzellen	22
2.6	Erstellung von Wachstumskurven.....	22
2.6.1	Zellzahlbestimmung	23
2.6.2	Wachstumskurve J774	23
2.6.3	Wachstumskurve Mono Mac 6	23
2.7	Nachweis der Phagozytose per Latex-Beads.....	23
2.7.1	Mausmakrophagen J774	23
2.7.2	Humane Monozyten Mono Mac 6.....	24
2.8	Infektionsversuche von J774 mit <i>S. pyogenes</i>	25
2.8.1	Vorbereitung der einzusetzenden Streptokokken	25
2.8.2	Vorbereitung der Zellkultur	25
2.8.3	Durchführung der Infektion	25
2.8.4	Bestimmung von Adhärenz und Internalisierung im CFU-Assay.....	26
2.9	Infektionsversuche von Mono Mac 6 mit <i>S. pyogenes</i>.....	27
2.9.1	Vorbereitung der einzusetzenden Streptokokken	27
2.9.2	Vorbereitung der Zellkultur	27
2.9.3	Bestimmung der notwendigen Antibiotikakonzentration für den Infektionsversuch.....	27
2.9.4	Durchführung der Infektion	28
2.9.5	Bestimmung von Adhärenz und Internalisierung im CFU-Assay.....	28
2.10	Doppelimmunfluoreszenzversuche J774	29
2.10.1	Vorbereitung der Infektion	30
2.10.2	Durchführung der Infektion mit <i>S. pyogenes</i>	30
2.10.3	Durchführung der Färbung	30
2.11	Doppelimmunfluoreszenzversuche Mono Mac 6	32
2.11.1	Vorbereitung der Infektion	32
2.11.2	Durchführung der Infektion mit <i>S. pyogenes</i>	32
2.11.3	Zentrifugation der infizierten Zellen	33
2.11.4	Durchführung der Färbung	33
2.12	Lebend/Tot-Färbung für Bakterien.....	33
2.12.1	Mausmakrophagen J774.....	34
2.12.2	Humane Monozyten Mono Mac 6.....	35

2.13	Differenzierung von Mono Mac 6 in Makrophagen	35
2.13.1	Vorbereitung der eukaryoten Zellen	35
2.13.2	Herstellung der Phorbolsterlösung	36
2.13.3	Durchführung der Differenzierungsversuche	36
2.14	Statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Mausmakrophagen J774	37
3.1.1	Wachstumsverhalten der J774	37
3.1.2	Phagozytoseassay	38
3.1.3	<i>S. pyogenes</i> Adhärenz an und Internalisierung in J774-Makrophagen	39
3.1.4	Lebend/Tot-Färbung von <i>S. pyogenes</i> nach der Infektion von J774	47
3.2	Humane Monozyten Mono Mac 6	49
3.2.1	Wachstumsverhalten der MM6	49
3.2.2	Phagozytoseassay	49
3.2.3	<i>S. pyogenes</i> Internalisierung in MM6-Monozyten	50
3.2.4	Lebend/Tot-Färbung von <i>S. pyogenes</i> nach der Infektion von MM6	55
3.2.5	Differenzierungsversuche	56
4	Diskussion	58
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis	68
7	Anhang	80
7.1	Abkürzungsverzeichnis	80
7.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	83
7.3	Thesen zur Dissertation	85
7.4	Selbstständigkeitserklärung	88
7.5	Danksagung	89

1 Einleitung

1.1 Bakteriologische und serologische Einordnung von *S. pyogenes*

Die Bakterienspezies *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) wird innerhalb der Ordnung der *Lactobacillales* der Familie der *Streptococcaceae* zugeordnet. Die Streptokokken sind grampositive, unbewegliche, nicht sporenbildende Bakterien. *S. pyogenes* gehört aufgrund seiner Fähigkeit, Erythrozyten zu lysieren, in die Gruppe der β -hämolisierenden Streptokokken. Kolonien auf Blutagar sind durch den mit dem Bakterienwachstum einhergehenden Hämoglobinabbau von einem klaren Hämolysehof umgeben. Die kugelförmigen Streptokokken teilen sich nur in einer Ebene. Das führt zur Bildung von Ketten unterschiedlicher Länge, auf die die Namensgebung zurückgeht (στρεπτος = griechisch: Kette; κοκκος = griechisch: Kern, Korn).

Rebecca Lancefield führte 1933 eine immunologisch-serologische Klassifikation der Streptokokken anhand unterschiedlicher Zellwandpolysaccharide ein (51). Danach zählt *S. pyogenes* zu den Gruppe-A-Streptokokken (GAS). GAS zeichnen sich durch einen komplexen Nährstoffbedarf aus und tolerieren für ihr Wachstum nur ein enges pH-Wert- und Temperaturspektrum. Ihr Stoffwechsel ist fakultativ anaerob. Zur epidemiologischen Einordnung wird *S. pyogenes* in verschiedene Serotypen unterteilt. Das am häufigsten dazu eingesetzte Antigen ist das M-Protein, ein C-terminal verankertes Oberflächenprotein mit hypervariablen Sequenzabschnitten im N-terminalen Bereich. Anhand dieser variablen Abschnitte und deren Reaktivität gegenüber Typ-spezifischen Antisera wird die Einteilung vorgenommen. In Ergänzung zur serologischen Einteilung hat sich in den letzten Jahren die *emm*-Typisierung auf Grundlage der *emm*-Gensequenz etabliert. Bis heute sind über 120 verschiedene M-Typen bekannt (20).

1.2 Klinische Bedeutung von *S. pyogenes*

1.2.1 Vorkommen

Der Mensch ist der einzige natürliche Wirt für *S. pyogenes*. Abhängig von Lebensalter, saisonalen Einflüssen und geographischen Bedingungen können 10% bis 30 % einer lokalen Population mit dem Bakterium besiedelt sein (32, 36, 75). Typische Kolonisationsorte sind Haut und Schleimhäute, v. a. der Nasopharynxbereich.

1.2.2 Typische durch *S. pyogenes* hervorgerufene Krankheitsbilder

S. pyogenes ist einer der häufigsten bakteriellen Krankheitserreger. Er ist in der Lage, eine Vielzahl von unterschiedlichen Krankheitsbildern hervorzurufen. Das Spektrum reicht von unkomplizierten Pharyngitiden bis zu schwer verlaufenden Erkrankungen wie der nekrotisierenden Faszitis oder dem Streptokokken-assoziiertem Toxic-Shock-Syndrom (STSS). Grundsätzlich lassen sich von Gruppe-A-Streptokokken ausgelöste Krankheitsbilder in 4 Gruppen einteilen:

Oberflächliche Infektionen der Haut und Schleimhäute:

S. pyogenes ist der typische Erreger der eitrigen Tonsillitis und Pharyngitis bei Kindern (12). An der Haut können Streptokokken das Erysipel und die Impetigo auslösen. Bestimmte M-Serotypen, wie z.B. M1, M3, M5, M6, M14 und M18, findet man häufig assoziiert mit Racheninfektionen und eventuell anschließendem rheumatischem Fieber, andere gehen einher mit Impetigo und nachfolgender akuter Glomerulonephritis (12).

Tiefere und schwere systemische Infektionen:

Man spricht von einer systemischen Erkrankung, wenn Bakterien aus normalerweise sterilem Gewebe isoliert werden (44). Greifen oberflächliche Infektionen der Haut auf tiefer gelegene Schichten über, kann es zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie der nekrotisierenden Faszitis, Myositis oder Zellulitis kommen. Selten kann eine Pharyngitis zur Ausbildung einer Pneumonie oder Meningitis führen.

Einleitung

Toxinvermittelte Erkrankungen durch Produktion von bakteriellen Superantigenen:

Einige Streptokokken-Subspezies sind in der Lage, bakterielle Superantigene zu produzieren. Diese sind im Stande, die T-Lymphozyten inadäquat stark zu stimulieren, was zu einem unkontrollierten Zytokinausstoß mit systemischer Entzündungsreaktion führt. So kann die Produktion der erythrogenen Toxine SpeA, SpeB und SpeC Scharlach auslösen. Durch den gleichen Mechanismus wird auch das Streptokokken-assoziierte Toxic-Shock-Syndrom (STSS) mit septischem Schock und Multiorganversagen verursacht (70, 71).

Nichteitrige Folgeerkrankungen:

Nach Streptokokken-Infekten kann es durch Autoimmunreaktionen zum akuten rheumatischen Fieber (ARF) oder einer akuten Post-Streptokokken-Glomerulonephritis (APSGN) kommen (18). Auslöser dieser Erkrankungen sind gegen Streptokokken gebildete Antikörper, die mit körpereigenen Antigenen in Herz, Gelenken und der Niere kreuzreagieren (12). Es konnte eine Assoziation bestimmter M-Subtypen mit der Auslösung von ARF und APSGN gefunden werden (siehe oben).

Weiterhin finden sich symptomlose Träger und chronisch-rezidivierende Infektionen. Hierfür ist die Fähigkeit einiger Stämme zur Internalisierung in pharyngeale Epithelzellen verantwortlich. Im intrazellulären Kompartiment sind die Bakterien vor den üblichen, bei Streptokokken-Infektionen eingesetzten β -Lactam-Antibiotika sowie vor der wirtseigenen Abwehr geschützt. Die asymptomatische Besiedelung ist unter epidemiologischen Gesichtspunkten wichtig, da die asymptomatisch Infizierten ein wichtiges Reservoir für GAS darstellen (73, 74, 75). Sowohl STSS als auch nekrotisierende Faszitis zählen zu den schwer verlaufenden systemischen Streptokokkenerkrankungen, die mit hoher Morbidität und Mortalität einhergehen (3, 5, 42). Es wird angenommen, dass bei beiden Streptokokken-Erkrankungen Streptokokken-Superantigene wichtige Induktoren der starken Entzündungsantwort sind (70, 71). Ein weiterer Pathomechanismus bei der nekrotisierenden Faszitis könnte die Spaltung von Zytokinen wie IL-8 durch GAS-Proteasen sein, die zum Ausbleiben der Chemotaxis der Leukozyten in

Einleitung

das infizierte Gewebe führt (30, 31). Es handelt es sich um zwei eigenständige Krankheitsbilder, die häufig, aber nicht ausschließlich gemeinsam auftreten.

1.2.3 Prädisponierende Faktoren und Epidemiologie der Infektionen

Verschiedene Faktoren bei Bakterien und Wirt bestimmen das Auftreten und die Schwere von Streptokokkenerkrankungen. Schwer verlaufende Krankheitsbilder werden besonders häufig bei Patienten unter 1 und über 70 Jahren gesehen. Weitere Risikofaktoren auf Seiten des Wirtes sind schlechte allgemeine Immunsituation z.B. bei chronischen Herz- oder Lungenerkrankungen, Malignomkrankung, Immunsuppression, Drogen-Abusus, Schwangerschaft, Krankenhausaufenthalt und Varizellen-Virus-Infektionen (15, 19).

Es wird geschätzt, dass jährlich mindestens 663000 neue Fälle von schwer verlaufenden Streptokokkenerkrankungen mit mindestens 163000 Todesfällen auftreten (5). Die Inzidenz von schwer verlaufenden GAS-Infektionen betrug in einer dänischen Studie jährlich ca. 2,3 auf 100000. Davon entfielen jeweils ca. 10% auf tiefe Weichteilinfektionen wie die nekrotisierende Faszitis und das STSS. Die Gesamtmortalität von systemischen Streptokokkenerkrankungen betrug 23% innerhalb von 30 Tagen, jedoch 56% beim STSS und 32% bei den Weichteilinfektionen (19).

Seit Mitte der achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde weltweit ein deutlicher Anstieg an systemischen Streptokokken-Erkrankungen wie der nekrotisierenden Faszitis und dem STSS festgestellt (18, 33). Außerdem wird wieder verstärkt über das Auftreten des akuten rheumatischen Fiebers berichtet (4, 18). Epidemiologische Studien zeigten, dass bestimmte M-Protein-Serotypen wie M1 und M3 besonders häufig mit systemischen Erkrankungen assoziiert sind (19, 39). Untersuchungen in den USA fanden für den Zeitraum zwischen 1970 und 1980 eine Verdopplung der Prävalenz dieser beiden Serotypen. Das deckt sich mit der Beobachtung, dass die verstärkte Inzidenz von systemischen GAS-Erkrankungen ein Produkt der verstärkten Prävalenz neuer, besonders virulenter Serotypen ist (18, 67).

1.3 Wichtige Virulenzfaktoren von *S. pyogenes*

Als Virulenzfaktoren bezeichnet man Moleküle oder Eigenschaften eines Bakteriums, die es befähigen, die spezifische oder unspezifische Immunreaktion des Wirtsorganismus zu überwinden bzw. deren Effektivität zu vermindern. Sie schaffen damit die Voraussetzung, dass der Wirt vom Bakterium besiedelt und geschädigt werden kann.

Gruppe-A-Streptokokken verfügen über verschiedenste Virulenzfaktoren zur Förderung von Anheftung (Adhäesine) und Eindringen (Invasine) in Wirtszellen, zur Ausbreitung im Gewebe (Aggressine) sowie zur Verhinderung der Phagozytose (Impedine). Die Expression dieser Virulenzfaktoren wird von den GAS über transkriptionelle Regulatorsysteme an Umwelteinflüsse und das Nährstoffangebot angepasst (48, 89). Hierzu zählen einzelständige Transkriptionsregulatoren und so genannte 2-Komponenten- Signaltransduktionssysteme. In den bereits komplett sequenzierten Genomen der Serotypen M1, M2, M3, M5, M6, M12, M18, M24 und M49 wurden neben ca. 30 einzelständigen Transkriptionsregulatoren durchschnittlich 13 solcher 2-Komponenten-Regulatorsysteme gefunden, 11 davon fanden sich identisch bei M1 und M18. Eines dieser Systeme ist das FasBCAX-System, auf welches weiter unten näher eingegangen wird (48).

1.3.1 M-Protein

Das M-Protein wurde erstmals 1928 von Rebecca Lancefield als Hauptantigen von *S. pyogenes* beschrieben. Es ist einer der wichtigsten Virulenzfaktoren der Gruppe-A-Streptokokken, da es den Bakterien Resistenz gegen eine *in vitro*- und wahrscheinlich auch *in vivo*- Phagozytose durch humane Granulozyten verleiht (34, 52).

Das M-Protein wird von der Mehrzahl der GAS-Stämme exprimiert. Es ist mit seinem konservierten C-terminalen Ende in der Zellmembran verankert. Das N-terminale Ende stellt eine hypervariable Region dar, die für die serologische Typspezifität der M-Proteine verantwortlich ist (21). Bei serologisch nicht typisierbaren GAS kann eine Analyse des für das M-Protein codierenden Gens

Einleitung

(*emm*) durchgeführt werden. Bis heute wurden 124 M-Typen über Serologie und *emm*-Typisierung unterschieden (20, 38).

Das M-Protein verfügt zudem über mehrere Eigenschaften und Funktionen, die zur Virulenz der GAS beitragen:

M-Proteine besitzen Bindungsstellen für humanes Fibrinogen, was die Bakterien vor Opsonierung durch Komplement schützt (97).

M-Proteine sind in die Adhärenz an humane Wirtszellen involviert, dabei erfolgt die Bindung von Fibronectin über den N-terminalen Teil der Proteine (11, 95). Die Anheftung an Zellen der Haut erfolgt über die Bindung des M-Proteins an CD46 auf der Oberfläche der Keratinozyten (24). Berkower et al. (1) beobachteten, dass M-Proteine verschiedener Serotypen unterschiedliche Auswirkungen auf die bakterielle Adhärenz und Invasion an eukaryote Zellen haben. Dies wurde mit unterschiedlichen Affinitäten von verschiedenen M-Proteinen für Rezeptoren an der Oberfläche der Wirtszellen erklärt. Dieses Phänomen könnte eine weitere Ursache für die unterschiedliche Virulenz von GAS-Serotypen sein.

Kürzlich wurde entdeckt, dass das M1-Protein der GAS die immunvermittelte Thrombozyten-Aktivierung und Thrombusbildung auslösen kann. Diese Wirkung könnte eine Erklärung sein für den prokoagulatorischen und proinflammatorischen Zustand, der typischerweise bei schweren Streptokokkeninfektionen gesehen wird (82).

1.3.2 Weitere Adhäsine

Weitere Moleküle der Streptokokken sind ebenfalls an der Adhäsion an eukaryote Zellen beteiligt, so z.B. Protein F1 (66) und F2 (50), FBP54 (9), die Lipoteichonsäure (12) und der Serumopazitätsfaktor SOF (72, 86). Diese von vielen GAS-Stämmen exprimierten Proteine binden Fibronectin und vermitteln so die Anheftung an die Zielzellen.

Einige Streptokokken-Serotypen exprimieren ein kollagenbindendes Protein (Cpa) auf ihrer Oberfläche. Dieses Molekül wird mit der Adhäsion von GAS in Geweben in Verbindung gebracht, die Kollagen-Typ 1 enthalten (49).

Die Hyaluronsäurekapsel der GAS kann über CD44 an murine Keratinozyten binden und so eine Anheftung der Bakterien bewirken (13).

1.3.3 Pyrogene Exotoxine

Pyrogene Exotoxine sind mikrobielle Superantigene, die starke Entzündungsantworten auslösen und so zu Organversagen und Schock führen können (45, 70). Sie sind wahrscheinlich verantwortlich für wenigstens einige Manifestationen des STSS (45, 71).

Das **streptokokkale pyrogene Exotoxin A (SpeA)** löste in Tierexperimenten Hypotonie, Fieber und andere typische Symptome des STSS aus (54, 55). Das Gen von SpeA wurde in der Mehrzahl der mit STSS assoziierten GAS-Stämme gefunden (29, 79, 93).

Das **streptokokkale pyrogene Exotoxin B (SpeB)** ist eine extrazelluläre Cystein-Protease, die von praktisch allen GAS exprimiert wird (41). Der Grad der Expression variiert von Isolat zu Isolat (23). SpeB spaltet extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin und Vitronectin (41) sowie Interleukin-1 β , einen potenten Entzündungsmediator, in die aktive Form des Moleküls (40). Es wird angenommen, dass SpeB wichtig ist für Entwicklung von Inflammation, Schock und Gewebszerstörung und damit eine wichtige Rolle in der Pathogenese von systemischen GAS-Erkrankungen einnimmt (45, 71).

1.3.4 Weitere Virulenzfaktoren

Zytolysine sind extrazellulär wirksame Exotoxine, die an der Zellmembran der Wirtszelle wirken und diese so schädigen. **Streptolysin O (SLO)** bindet an das Cholesterol eukaryoter Membranen und kann mittels Oligomerisierung Poren in die Membranen einfügen. Dies führt zur Lyse der Zellen (2). **Streptolysin S (SLS)** ist ein sauerstoff-stabiles, nicht immunogenes Zytolysin, das für die β -hämolytische Aktivität der GAS hauptverantwortlich ist (6, 69).

Die **Streptokinase (Ska)** ist ein 46kDa großes extrazelluläres Streptokokken-Protein, das in der Medizin als Fibrinolytikum eingesetzt wird. Dieses Enzym kann Plasminogen in Plasmin umwandeln, was zur Auflösung von zur Immunabwehr gebildeten Gerinnseln führt (37).

Einleitung

Die **C5a-Peptidase** der Streptokokken inaktiviert C5a, einen chemotaktisch wirksamen Bestandteil des Komplementsystems. So interferiert sie mit der Anlockung von PMNs zum Ort der Infektion (96).

Das **Mac-Protein** hemmt die Funktion von professionellen Phagozyten durch Bindung an den Fc γ RIIIB-Rezeptor auf der Oberfläche von PMN (56). Fc γ RIIIB ist ein nur auf Neutrophilen exprimierter Rezeptor, der mit immunkomplexiertem IgG interagiert.

1.4 Adhäsion und Invasion von eukaryoten Zellen

Lange galten GAS als ausschließlich extrazelluläre Bakterien. Aber es konnte gezeigt werden, dass die Bakterien nicht nur an verschiedenste Wirtszellen adhären und in diese eindringen, sondern auch über längere Zeiträume in ihnen überleben können (10, 11, 63).

Um eine Infektion zu etablieren, müssen sich die GAS an das Epithel des Wirts anheften. Dazu werden spezifische Zielmoleküle, die Integrine, auf der Oberfläche der eukaryoten Zellen benutzt. Es wird vermutet, dass über die Lipoteichonsäure zunächst eine relativ lockere Bindung zwischen Wirtszelle und Bakterium hergestellt wird. Dann kann mit Hilfe einer Reihe von weiteren Adhäsinen eine feste spezifische Bindung erreicht werden (10, 11).

Für den zweiten Schritt der Bindung werden meist extrazelluläre Matrixmoleküle wie Fibronectin, Kollagen und Laminin verwendet. Diese Proteine sind über Integrine fest an die Oberfläche der eukaryoten Zelle gebunden und dienen als Rezeptor für spezifische Adhäsine der GAS. Wichtige fibronectinbindende Proteine von *S. pyogenes* sind Protein F1 und F2, SOF, FBP 54, Fba und das Lsp (47). Cpa ist ein kollagenbindendes Protein, das bei der Adhäsion von GAS an Kollagen-Typ 1 eine Rolle spielen könnte.

Wie bereits oben erwähnt, können bestimmte M-Proteine (M1 und M3) ebenfalls Fibronectin binden und so eine Adhäsion bewirken. Es existiert auch ein fibronectinunabhängiger Mechanismus, der durch M-Proteine vermittelt wird. Die Hyaluronsäurekapsel kann ebenfalls eine streptokokkale Adhäsion bewirken, jedoch nur an Wirtszellen, die CD 44 exprimieren. (10, 13).

Einleitung

Protein F1 ist ein weiteres Adhäsion, das die Aufnahme von Streptokokken fördert. Ähnlich wie das M-Protein ist das Protein F1 über Fibronectin an die Integrine der Wirtszelle gebunden. Durch Konformationsänderungen des Fibronectinmoleküls kann die Internalisierung des Bakteriums getriggert werden (10).

Auffällig ist bei der spezifischen Adhäsion ein Gewebstropismus, d.h. bestimmte Adhäsine werden bevorzugt bei bestimmten Wirtszelltypen eingesetzt. Zum Beispiel kann das M-Protein die Adhärenz an HEp2-Zellen und Keratinozyten vermitteln, nicht jedoch an bukkale Zellen und Langerhans-Zellen (3). Die Expression der Adhäsine wird über Transkriptionsregulatoren kontrolliert (10).

Nach der Adhäsion besteht die Möglichkeit der Internalisierung in die eukaryote Zelle. Bei nichtphagozytierenden Zellen kann durch die Interaktion von M-Proteinen, Fibronectin oder Laminin und Integrinen die Aufnahme der GAS eingeleitet werden. Dies induziert über eine Signalkaskade eine Aktin-Polymerisation mit nachfolgender Ingestion durch einen Reißverschlussmechanismus. Einmal internalisiert, werden die Streptokokken in Phagosomen oder frei im Zytoplasma gefunden. Im Zytoplasma können sie dann in der Lage sein, sich zu vermehren (64).

Eine weitere Möglichkeit nach der Adhäsion stellt die **parazelluläre Translokation** dar. Die Hyaluronsäure-vermittelte Adhäsion von Streptokokken an CD44 induzierte bei Keratinozyten Zytoskelett-Veränderungen, Zellmembran-Fältelungen und Rissbildungen von interzellulären Junctionen. Durch letzteres könnte die Passage der GAS durch das Epithel in tiefere Gewebsschichten erleichtert werden (14).

Eine andere Option neben der Invasion von eukaryoten Zellen stellt die **Kolonisation** des Wirtes dar. Beim Wirt spielen Faktoren wie Immunglobulin-Menge im Speichel und residente Nasopharynx-Flora eine Rolle. Auf Seiten der Bakterien kann die C5a-Peptidase C5a inaktivieren und so den Anstrom von Neutrophilen vermindern und das Überleben im Wirt fördern. Es wird angenommen, dass adhärenzierte GAS im Rahmen der Kolonisation die Expression ihrer Oberflächenmoleküle modifizieren (10).

1.5 Rolle der Invasion im natürlichen Infektionsprozess der GAS

Das intrazelluläre Kompartiment bietet den Streptokokken klare Vorteile. Sie sind sowohl vor den üblicherweise bei Streptokokkenerkrankungen eingesetzten Antibiotika als auch vor der Immunabwehr des Körpers geschützt. Von vielen Bakterien ist schon lange bekannt, dass sie sich ihre eigene intrazelluläre Nische im Zytoplasma eukaryoter Zellen schaffen. Dazu zählen unter anderem Mykobakterien (16), Salmonellen (80), Yersinien, Shigellen (16), Listerien (53) und Bordetellen (80).

Für GAS wurde dies erstmals 1994 nachgewiesen. La Penta (53) zeigte, dass GAS effizient Zellen des menschlichen Respirationstrakts invadieren und in den Zellen persistieren können. Die Streptokokken wurden elektronenmikroskopisch intrazellulär in Vakuolen nachgewiesen. Interessant war auch, dass verschiedene Stämme eine unterschiedliche Invasionskapazität aufwiesen. Greco et al. (28) bestätigten ein Jahr später diese Ergebnisse. Es wurde die Aufnahme von GAS und Gruppe-B-Streptokokken (GBS) in eukaryote Zellen (HeLa, HEp2 und HUVEC) verglichen und festgestellt, dass die GAS eine höhere Invasionseffizienz aufwiesen, aber intrazellulär allmählich abgetötet wurden, während die GBS über 24h p.i. persistierten.

Es wurden verschiedene Theorien zur Rolle der Invasion bei den Streptokokken aufgestellt. La Penta et al. 1994 schloss aus seinen Ergebnissen, die Invasion könnte als erster Schritt für eine **Gewebeinvasion** dienen. Andere Autoren sahen in der Invasion einen Mechanismus des angeborenen Immunsystems, der mit der **bakteriellen Tötung** endet (81). Eine weitere Hypothese besagt, dass die Internalisierung ein Mechanismus der Bakterien darstellt, um die Wirtsabwehr zu unterwandern und eine geschützte intrazelluläre Nische zu erreichen. Dies ermöglicht den Bakterien eine **Persistenz** im Wirt und mögliche rekurrente Infektionen (12, 47, 76).

1.6 Regulation der Expression der Virulenzfaktoren durch das FasBCAX-System

Das **FasBCAX-System** ist ein wachstumsphasen-assoziiertes Regulator-System der Expression von Virulenzfaktoren der GAS. Es wurde auf Basis von Homologien zu Zwei-Komponenten-Regulator-Systemen in *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* identifiziert. Das Fas-Operon (Abbildung 1) kodiert für zwei Sensor-Histidinkinasen und einen Antwort-Regulator. Haupt-Effektor dieses Systems ist eine untranslatierte regulatorische RNA, die durch *fasX* kodiert wird. Die Aktivierung des *fas*-Operons führte in ersten Untersuchungen zu transkriptioneller Herunterregulierung von Genen, die für Adhäsine (*fbp54*, *mrp*) kodieren, sowie gleichzeitiger Hochregulierung von Genen für sezernierte Aggressine (*sagA*, *Ska*) (46, 48).

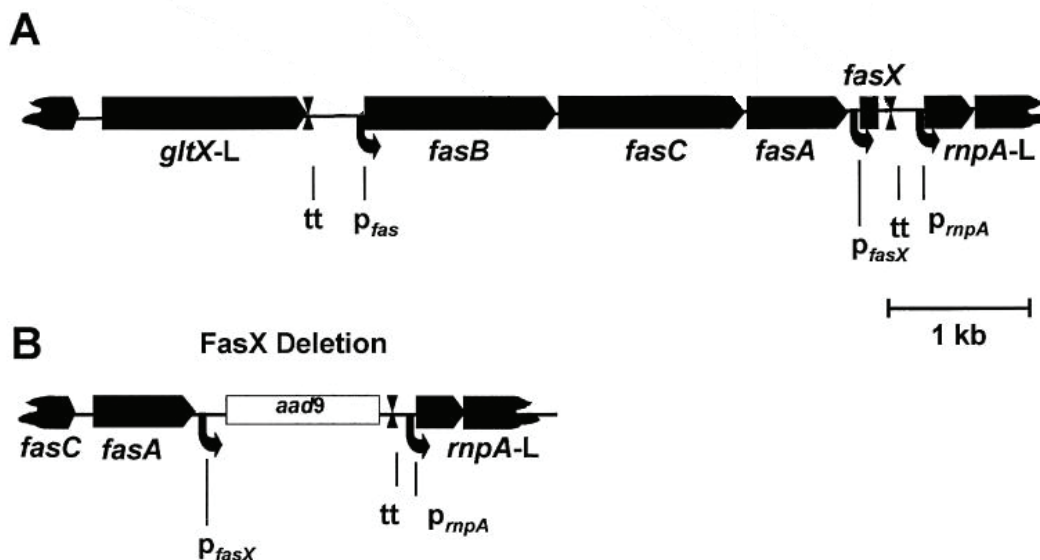


Abbildung 1

A Aufbau des Fas-Regulon und der angrenzenden Gene. Die schwarzen Balken entsprechen den identifizierten Genen. *gltX-L*: Glutaryl-tRNA-Synthase-ähnliches Gen. *mrpA-L*: RNase-P-Protein-ähnliches Gen; *fasB-X*: fибронектин/fibrinogen-bindende/hämolytische Aktivität/Streptokinase-Regulator-Gene; *tt*: mutmaßlicher Transkriptionsterminator; *P*: mutmaßliche Promotorsequenz

B Aufbau des Fas-Regulon nach Ersatz von *fasX* durch eine *aad9* Spectinomycin-Resistenzkassette (Abbildung entnommen aus Kreikemeyer et al. 2001 (46))

Einleitung

Die Δ *fasX*-Mutante wurde durch Deletionsmutagenese aus einem M49-Wildtypstamm erzeugt (Abbildung 1). Durch diese Strategie bleibt theoretisch die Transkription von *fasBCA* unbeeinflusst. Die Daten zum Verhalten der Mutante sind widersprüchlich. Zunächst wurde eine verstärkte Expression von extrazellulären matrixproteinbindenden Adhäsinen und eine reduzierte Expression von sezernierten Virulenzfaktoren (z.B. Streptokinase und Streptolysin S) beschrieben (46). Dies ließ den Schluss zu, dass der Fas-Regulator als molekularer Schalter zwischen einem lokal adhätierenden und persistierenden oder einem gewebserstörenden Phänotyp fungiert.

Andere Ergebnisse zeigten eine eindeutig verminderte Anheftung der Mutante an HEp-2-Zellen, was für eine verminderte Expression von Adhäsinen spricht. Diesen Ergebnissen zufolge unterstützt das Fas-System eine verstärkte Adhärenz und Internalisierung, eine massive Zytokin-Genexpression und Zytokinausschüttung, Wirtszellapoptose durch Caspase-2-Aktivierung und Zytotoxizität. Daher wird vermutet, dass das FAS-System an lokaler Gewebserstörung und genereller bakterieller Aggressivität beteiligt ist (43).

1.7 Monozyten/Makrophagen

Monozyten und Makrophagen sind Zellen der unspezifischen Immunabwehr des Körpers. Während Monozyten im Blut rezirkulieren, sind Makrophagen gewebständige Zellen, die zum Teil schon während der Ontogenese in das Gewebe einwandern oder sich aus Monozyten entwickeln, die in das Gewebe eingetreten sind (35).

1.7.1 Funktion

Monozyten und Makrophagen spielen als Effektoren und Regulatoren der angeborenen Immunität eine zentrale Rolle in der Wirtsabwehr. Sie sind wesentlich beteiligt an der schnellen unspezifischen Antwort des Immunsystems in der frühen Phase der Infektion und stellen aufgrund der Fähigkeit zur Antigenpräsentation ein wichtiges Bindeglied zur adaptativen Immunabwehr dar (22). Die Infektion kann so eingedämmt werden, bis eine spezifische Antwort des adaptativen Immunsystems zur Verfügung steht (16, 80).

Einleitung

Die Makrophagen sind auch insbesondere für die Bekämpfung von GAS von großer Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass B- und T-Zell-defiziente Mäuse genauso empfänglich für GAS-Infektion sind wie immunkompetente Mäuse (60). Das lässt den Schluss zu, dass die Abwehr von GAS im Wesentlichen unabhängig vom adaptativen Immunsystem funktioniert. Auch Goldmann et al. (27) betonte die Bedeutung von Makrophagen für die frühe Kontrolle der GAS-Infektion.

1.7.2 Effektormechanismen

Eine wichtige Eigenschaft dieser Zellen ist die **Phagozytose**. Es können Mikroorganismen, rote Blutzellen und andere Materialien aufgenommen werden. Meist werden Mikroorganismen erst phagozytiert, nachdem sie opsoniert, d.h. markiert, wurden. Dies geschieht mit aktiviertem C3 und Immunglobulin (92). Es besteht auch die Möglichkeit, nicht-opsonierte Mikroorganismen und andere Zellen über Zucker-Moleküle auf ihren Zelloberflächen an lektinähnlichen Rezeptoren (Toll like Receptors, TLR) auf den Monozyten zu binden. Nach der Bindung der Mikroorganismen wird über eine Signalkaskade die Internalisierung eingeleitet. Die Internalisierung erfolgt mit Hilfe von Pseudopodien im Reißverschluss-mechanismus. Letztendlich befindet sich das Bakterium in einem Phagosom, welches mit Lysosomen fusioniert. Hier kommen dann die **antimikrobiellen Mechanismen** der Monozyten und Makrophagen zum Zuge. Die sauerstoffabhängigen Mechanismen, auch „respiratory burst“ genannt, führen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten einschließlich dem Superoxidanion O_2^- und Wasserstoffperoxid H_2O_2 . Nach Fusion des Phagosoms mit Granula, die Peroxidase enthalten, bildet das Enzym aus Wasserstoffperoxid und einem Halogen wie Chlor hypochlorige Säure $HOCl$, welche mikrobizide Eigenschaften hat. Die sauerstoffunabhängigen Mechanismen schließen die Vakuolen-Ansäuerung, den Nahrungsentzug und den Einsatz von granula-assoziierten antimikrobiellen Polypeptiden ein. Zu letzteren zählen das Lysozym, Defensine, Serprocidine (z.B. Cathepsin G, Elastase, Proteinase 3, Azurocidin) und histonähnliche murine mikrobizide Proteine (MUMPs) (91).

Nach Aufnahme und Digestion der Pathogene besitzen Makrophagen die Fähigkeit, **Antigene** zu prozessieren und diese zusammen mit dem major

Einleitung

histocompatibility complex, MHCII, den T-Lymphozyten zu **präsentieren**. Damit stellen sie ein wichtiges Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunabwehr dar (22).

Eine weitere wichtige Funktion besonders für exsudative Makrophagen und in geringerem Maße auch für Monozyten ist die **Sekretion von biologisch aktiven Substanzen**. Manche dieser Substanzen werden konstitutiv gebildet und sezerniert, andere nur nach Aktivierung der Zellen. Die sekretorischen Produkte können eingeteilt werden in Enzyme (z.B. Elastase, Kollagenase, Proteoglykan-degradierendes Enzym, Plasminogenaktivator, lysosomale saure Hydrolasen, Angiotensin-converting Enzym, Arginase), Enzyminhibitoren (z.B. α 2-Makroglobulin, Plasminogenaktivatorinhibitor, α 1-Antitrypsin), Arachidonsäure-Derivate (z.B. Prostaglandine, Thromboxane), Plasmaproteine (z.B. Komplementfaktoren, Gerinnungsfaktoren, Fibronektin, Apoprotein E) und viele Zytokine, die Funktionen oder das Wachstum von anderen Zellen regulieren (z.B. IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , GM-CSF, Angiogenesefaktor, IFN γ). Das Repertoire an sekretorischen Produkten kann abhängen von Reifegrad und Aktivierungszustand der Zelle sowie der Lokalisation im Körper (91).

1.8 Aufgabenstellung

Es ist bereits längere Zeit bekannt, dass Gruppe-A-Streptokokken in Epithelzellen eindringen und persistieren können. Mit Blick auf die starke Zunahme der systemischen Streptokokkenerkrankungen in den letzten Jahrzehnten stellte sich die Frage, ob die Fähigkeit zur Invasion von und Persistenz in phagozytierenden Zellen hierfür ursächlich sein könnte.

Aufgabe dieser Arbeit war, die Interaktion von 6 verschiedenen Stämmen von *S. pyogenes* mit 2 Immunzelllinien zu untersuchen. Hierfür wurde die Mausmakrophagenzelllinie J774 und die humane Monozytenzelllinie Mono Mac 6 ausgewählt. Mit 2 unterschiedlichen Methoden wurde das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten der Bakterien an diese Zelllinien untersucht. Damit sollte analysiert werden, ob die Invasion von Phagozyten möglicherweise eine Rolle im natürlichen Infektionsprozess der GAS spielt. Nutzen vielleicht die mit den schwer

Einleitung

verlaufenden Erkrankungen häufig assoziierten Streptokokken-Subtypen phagozytierende Zellen zur systemischen Dissemination?

Die fünf untersuchten GAS-Wildtypen wurden im Hinblick auf Häufigkeit und typischerweise durch diese Serotypen ausgelöste Krankheitsbilder ausgewählt. Zusätzlich wurde das Verhalten einer Mutante von Serotyp M49 untersucht, in der das FasBCAX-System, ein Regulator-System der Expression von Virulenzfaktoren der GAS, durch Deletionsmutagenese ausgeschaltet wurde. Es sollte der Einfluss des Fas-Genabschnitts auf die Adhärenz an und Invasion von Phagozyten geklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Bakterienstämme und Immunzellen

2.1.1 Bakterien

S. pyogenes (Serotyp M1) Patientenisolat

S. pyogenes (Serotyp M3) Patientenisolat

S. pyogenes (Serotyp M6) Patientenisolat

S. pyogenes (Serotyp M18) Patientenisolat

S. pyogenes (Serotyp M49) Patientenisolat

S. pyogenes (Serotyp M49) Patientenisolat mit einer Deletion im FasBCAX-2-Komponentensystem (*M49 Δ fasX*)

Verschiedene M-Serotypen lösen häufig typische Krankheitsbilder aus (93).

M1 und M3 zählen zu den weltweit am häufigsten isolierten Serotypen (78, 87, 88). Sie verursachen häufig einfache Pharyngitiden. Seit Mitte der 80er Jahre sind sie auch auffällig häufig mit invasiven Krankheitsbildern wie Septikämien, STSS und nekrotisierender Faszitis assoziiert (7, 39).

M6 ist ein ebenfalls häufig isolierter Serotyp und wurde bei einigen epidemiologischen Studien mit Meningitis assoziiert (93). Er wird häufig bei Patienten mit Pharyngitis oder Scharlach isoliert. Es wurden hohe M6-Titer bei Patienten mit akuter Psoriasis guttata gefunden (98).

In den USA wurde der Serotyp **M18** mit mehreren Ausbrüchen des akuten rheumatischen Fiebers assoziiert (39). Der Vergleich von 36 M18-Stämmen aus verschiedenen Regionen zeigte nur geringe Unterschiede der Genome (83).

Serotypen wie M1, M3, M6 und M18, die bevorzugt Pharyngitiden auslösen, sind meist auch mit dem akuten rheumatischen Fieber assoziiert. Diese treten gewöhnlich saisonal gehäuft im Herbst und Winter auf und produzieren keinen Opazitätsfaktor (12).

M49 ist selten mit Pharyngitis sondern häufiger mit Pyodermien und akuter Glomerulonephritis assoziiert. Hautinfektionen-auslösende Stämme wie M49

können die akute Glomerulonephritis, aber nicht das ARF als Folgeerkrankung verursachen (12, 75).

2.1.2 Eukaryote Zelllinien

Für die Versuche wurden 2 eukaryote Zelllinien ausgewählt. Bei beiden handelt es sich um Immunzelllinien, die seit längerem etabliert sind.

Mausmakrophagen J774

Die Mausmakrophagenzelllinie J774 wurde 1968 aus dem Tumor einer weiblichen BALB/c-Maus etabliert. Es wurde beschrieben, dass die Zellen Lysozym und Interleukin-1 synthetisieren und Rezeptoren für Immunglobulin und Komplement haben. Die Zellen sind relativ klein und wachsen adhärent. Die adhären Zellen runden sich nach ein paar Tagen in Kultur ab (77).

Humane Monozyten Mono Mac 6

Diese Zelllinie wurde 1985 von einem Patienten mit akuter monozytärer Leukämie isoliert. Die Mono Mac 6 sind runde bis vielgestaltige Zellen, die sich in Suspension befinden. Gelegentlich adhären sie locker an die Oberfläche. Sie ist die einzige humane Monozytenzelllinie, die von sich aus phänotypische und funktionelle Merkmale von reifen Monozyten exprimiert (99). Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Andreas Essig (Ulm) zur Verfügung gestellt.

2.2 Kulturmedien

2.2.1 Kulturmedien für Gruppe-A-Streptokokken

Die Kulturmedien wurden vor Gebrauch bei 121°C autoklaviert. Der Agar wurde in 20 ml Portionen in sterile Kunststoffschalen von 90mm Durchmesser gegossen. Die folgenden Angaben der Medien beziehen sich auf das Volumen von 1 Liter und wurden zur kulturellen Anzucht von Streptokokken verwendet.

Material und Methoden

Todd-Hewitt-Yeast-Bouillon: (THY-Bouillon)	36,4g Fertignährmedium 5g Hefeextrakt in 1l Aqua dest. lösen und autoklavieren
THY-Agar:	36,4g Todd-Hewitt-Bouillon 5g Hefeextrakt 15g technischer Agar in Aqua dest. ad 1000ml lösen und autoklavieren

Blutagar (BECTON, DICKINSON, Heidelberg): Columbia Agar mit 5% Schafblut

Antibiotikazusatz:

Zur selektiven Anzucht der M 49 Δ *fasX* -Mutante wurden THY-Agar THY-Bouillon nach dem Abkühlen auf 50°C mit 60mg/l Spectinomycin versetzt.

2.2.2 Kulturmedien für eukaryote Zellen

Die J774- Zellen wurden in folgendem Medium angezüchtet:

Dulbeccos Modified Eagle Medium wurde vor der Verwendung mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin-Stocklösung (mit 5000 U/mL Penicillin und 5000µg/mL Streptomycin) versetzt.

Für die humanen Monozyten Mono Mac 6 wurde folgendes Medium verwendet:

RPMI 1640 Medium wurde vor der Verwendung mit folgenden Lösungen versetzt:

10 % FCS

1% Glutamin, zuvor 0,2µm sterilfiltriert

1% Insulin, 0,2µm sterilfiltriert

1% Nichtessentielle Aminosäuren, 0,2µm sterilfiltriert

1% Oxalacetat, 0,2µm sterilfiltriert

1% Pyruvat, 0,2µm sterilfiltriert

Material und Methoden

Sowohl die Insulinlösung als auch die Oxalacetatlösung müssen vorher hergestellt werden.

Herstellung dieser Lösungen:

Insulinlösung:

50 ml Pucks Saline A wurden über Nacht in einer Gewebekulturflasche im CO₂-Brutschrank inkubiert, so dass am nächsten Tag ein pH-Umschlag festzustellen war. Dieser Lösung wurden dann 60ml einer 7,5%igen Natriumbikarbonatlösung und 100mg Insulin zugefügt. Davon wurden Aliquots in benötigter Menge eingefroren.

Oxalacetatlösung:

5g Oxalacetat wurden in 378,5 ml Pucks Saline aufgelöst und in Aliquots eingefroren.

2.3 Chemikalien, Kits, Puffer

Adhäsionsobjektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Alexa Fluor 488 goat-anti-rabbit-IgG (H+L) highly cross-adsorbed, 2mg/mL	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa Fluor 647 goat-anti-rabbit-IgG (H+L) highly cross-adsorbed, 2mg/mL	Molecular Probes, Eugene, USA
Bacterial Viability Kit	Molecular Probes, Eugene, USA
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deckgläser , Durchmesser 12 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht
DMEM-Medium : Dulbecco`s MEM (mit Glutamax-1 (=L-Alanyl-L-Glutamin)), mit Natriumpyruvat, 4500mg/l Glucose, Pyroxidin)	GIBCO, Auckland, Neuseeland
DMSO	Serva, Heidelberg
FCS (Foetal bovine serum), mycoplasmen- und virusgetestet	GIBCO, Auckland, Neuseeland

Material und Methoden

Gewebekulturflaschen steril, 250 ml, 75 cm ² , mit Filter	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturplatten 12 Well und 24 Well steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Hefeextrakt , neutral, gepulvert	Oxoid, Basingstoke, England
Insulin (aus Rinder-Pankreas)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Latex Beads aus Polystyrol, 1µm, 10%ige Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamin 200 MM (100x)	GIBCO, Auckland, Neuseeland
Natrium-Bicarbonat 7,5%	GIBCO, Auckland, Neuseeland
Natrium-Pyruvat MEM 100 MM	GIBCO, Auckland, Neuseeland
NEAA (nichtessentielle Aminosäuren)	GIBCO, Auckland, Neuseeland
Oxalacetat (98%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin mit 5000 U/mL Penicillin und 5000µg/mL Streptomycin	GIBCO, Auckland, Neuseeland
Petrischalen , 92 x 16mm, mit Nocken	Sarstedt, Nümbrecht
Poly-L-Lysin , 0,1% in Wasser	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Puck's Saline A mit NaHCO ₃ , ohne Calciumchlorid, Mg-Sulfat, Kalium-Phosphat und Natrium-phosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Streptococcus Gruppe A-Antikörper polyklonal, affinitätsgereinigt, Kaninchen 6mg/ml	Biodesign International, Saco, USA
RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin	GIBCO, Auckland, Neuseeland
Spectinomycin , 10mg/ml	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Technischer Agar Nr.3	Oxoid, Basingstoke, England
THB : Todd-Hewitt-Bouillon	Oxoid, Basingstoke, England
Triton X-100	Ferak, Berlin
Trypanblau Trypan Blue Stain 0,4%	GIBCO, Auckland, Neuseeland
Trypsin: Trypsin-EDTA (1x)	GIBCO, Auckland, Neuseeland
Zellschaber , gammasterilisiert, pyrogenfrei	TPP, Trasadingen, Schweiz

Puffer:

PBS (Phosphat Buffered Saline)

Herstellung von einfach konzentriertem PBS (1x):

0,2 g Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)

0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

8 g Natriumchlorid (J.T. Baker, Deventer, Holland)

2,16 g Dinatriumhydrogenphosphat-heptahydrat (Merck, Darmstadt)

mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen, auf einen pH von 7,4 einstellen und autoklavieren. Verwendet wurde grundsätzlich 1xPBS.

2.4 Laborgeräteausstattung

Neben der üblichen Ausstattung eines molekularbiologischen Labors standen folgende Geräte zur Verfügung:

CO ₂ -Inkubator	HERAEUS (Osterode)
Smart Spec 300 (Photometer)	BIO-RAD (Hercules-CA (USA))
Zentrifuge pico	HERAEUS (Osterode)
Varifuge 3.OR	HERAEUS (Osterode)
Fluoreszenzmikroskop B60	OLYMPUS (Hamburg)

2.5 Stammhaltung und Kultivierung der Zellen

2.5.1 Gruppe-A-Streptokokken

Die Aufbewahrung der Streptokokkenstämme erfolgte als Langzeitlagerung bei -80°C in Glycerinkulturen und für den Zeitraum von bis zu 5 Tagen bei 4 bis 8°C auf THY-Agarplatten oder Blutagarplatten.

Die Anzucht und Passage der Streptokokken-Wildtypstämme erfolgte auf Schafsblutagar und die der Δ *fasX* -Mutante auf Spectinomycin-haltigem THY-Agar, jeweils bei 37°C in einer 5%-CO₂-Atmosphäre.

Für die Infektionsversuche mit diesen Stämmen wurden die Bakterienkulturen für circa 16 Stunden in THY-Bouillon im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) ohne Schütteln bebrütet.

2.5.2 Kultivierung der Immunzellen

Mausmakrophagen J774

Die adhärent wachsenden Mausmakrophagen wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS kultiviert.

Die Zellen wuchsen in Gewebekulturflaschen (75 cm²) bis zur Konfluenz und wurden dann im Verhältnis 1:5 gesplittet. Dazu wurden die Zellen nach Abpipettierung des verbrauchten Mediums zunächst mit 1ml Trypsin gespült, um noch vorhandene Mediumreste zu entfernen. Nach erneuter Zugabe von 1ml Trypsin erfolgte eine 10-minütige Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂). Da die Trypsinierung der Zellen auch bei längerer Inkubation unvollständig war, wurde die Gewebekulturflasche zunächst auf 10 ml mit DMEM-FCS-Medium aufgefüllt und die Makrophagen vollständig mit Hilfe eines Zellschabers vom Untergrund abgelöst. Von diesen 10 ml Zellsuspension wurden 2 ml in eine neue Gewebekulturflasche überführt und auf 20 ml mit DMEM-FCS-Medium aufgefüllt.

Humane Monozyten Mono Mac 6

Die humanen Monozyten sind nicht adhärent wachsende Zellen, die in RPMI-Medium kultiviert wurden. Ab einer Konzentration von mind. $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml konnte die Kultur 1:5 gesplittet werden.

2.6 Erstellung von Wachstumskurven

Alle Versuche waren so konzipiert, dass die eukaryoten Zellen circa 24 Stunden vor Versuchsbeginn in die Wells einer 12-Well-Gewebekulturplatte eingesetzt werden. Um für die Versuche die gleichen Ausgangsbedingungen zu gewährleisten, wurde das Wachstumsverhalten der eukaryoten Zellen mit Hilfe von Wachstumskurven untersucht.

Die Zellzahlen wurden in Abständen von 24 Stunden über einen Zeitraum von 5 Tagen bestimmt. Pro Tag wurden 2 Wells gezählt, aus denen der Mittelwert gebildet wurde.

2.6.1 Zellzahlbestimmung

Es wurden nur die lebenden Zellen gezählt. Um diese von den abgestorbenen Zellen unterscheiden zu können, wurde zuvor eine Färbung mit Trypanblau (0,4%) durchgeführt, bei der sich die toten Zellen blau anfärben. 15µl der Zellsuspension wurden mit 15µl Trypanblau gemischt und in einer Neubauerzählkammer gezählt.

2.6.2 Wachstumskurve J774

100000 Zellen pro ml wurden in jedes Well von zwei 12-Well-Gewebekulturplatten überführt. In Abständen von 24h wurden die Zellen von 2 Wells mit 500µl Trypsin inkubiert (10 Minuten, 37°C, 5% CO₂), anschließend mit 500 µl DMEM-FCS-Medium aufgefüllt und mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl dieser Zellsuspension.

2.6.3 Wachstumskurve Mono Mac 6

Das Vorgehen unterschied sich von dem der Mausmakrophagen, da die Mono Mac 6 Suspensionszellen sind. Es wurden 100000 Zellen pro ml in jedes Well einer 12-Well-Gewebekulturplatte gegeben. Nach jeweils 24 Stunden wurde der Inhalt eines Wells gezählt. Dabei war darauf zu achten, dass die im Brutschrank verdunstete Flüssigkeit mit RPMI-Medium wieder auf 1ml aufgefüllt wurde.

2.7 Nachweis der Phagozytose per Latex-Beads

2.7.1 Mausmakrophagen J774

Vorbereitung der Zellkultur

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die J774-Zellen trypsiniert, auf eine Zellzahl von 300000 Zellen/ml eingestellt und je 1ml dieser Zellsuspension in die Wells einer 12-Well-Kulturschale überführt.

Durchführung des Phagozytoseassays

- Nach Herstellung einer 0,01%igen Latex-Bead-Suspension aus einer 10%igen Latex-Bead-Suspension mittels 1000facher Verdünnung mit DMEM wurde der Medium-Überstand von dem Zellrasen abgenommen und gegen die 0,01%ige Latex-Bead-Suspension ersetzt.
- Nach 1-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ wurde die Suspension wieder abgenommen, der Zell-Monolayer 3mal gründlich mit PBS gespült und neues Medium ohne Beads zugegeben.
- Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung. Es wurde die Gesamtzahl der Zellen, die Gesamtzahl der intrazellulären Beads und die Zahl der Zellen ohne Beads jeweils pro Gesichtsfeld bestimmt. Insgesamt wurden mindestens 200 Zellen pro Well geprüft.

2.7.2 Humane Monozyten Mono Mac 6

Vorbereitung der Zellkultur

Vor Versuchsbeginn wurden die Mono Mac 6 auf eine Zellzahl von 1000000 Zellen/ml eingestellt, und 0,5ml dieser Zellsuspension in die Wells einer 12-Well-Kulturschale überführt.

Durchführung des Phagozytoseassays

- Zunächst wurde aus einer 10%igen Latex-Bead-Suspension mittels Verdünnung mit DMEM eine 0,02%ige Suspension hergestellt.
- 0,5ml dieser Suspension wurden den Zellen zugesetzt. Damit ergab sich ein Gehalt an Latexbeads von 0,01% und eine Zellzahl von 500000 Zellen/ml im Ansatz.
- Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ wurde der Versuchsansatz auf Eis gestellt, um die Phagozytosevorgänge zu stoppen.
- Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung nach der gleichen Vorgehensweise wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben.

2.8 Infektionsversuche von J774 mit *S. pyogenes*

2.8.1 Vorbereitung der einzusetzenden Streptokokken

- Circa 16 Stunden vor Versuchsbeginn wurde eine Übernachtskultur (ÜNK) von den benötigten Stämmen angelegt. Das hierfür verwendete THY-Medium musste bei der Δ *fasX* -Mutante mit Spectinomycin versetzt werden.
- Am Versuchstag erfolgte die Zentrifugation der ÜNK bei 1581 g für 5 Minuten und die anschließende Resuspension in 10ml PBS.
- Die Lösung wurde in der Folge 2mal bei 1581 g 5 Minuten zentrifugiert und resuspendiert.
- Nach Aufnahme der Bakterien in 10ml DMEM-Medium konnte die Lösung auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt werden.
- Diese Lösung wurde mit DMEM-Medium um den Faktor 10 verdünnt.
- Für die Bestimmung der Adhärenz- und Internalisierungskapazität musste die in einer Suspension dieser Konzentration enthaltene Zahl teilungsfähiger Zellen (colony forming units, CFU) bei jedem Versuch mittels einer Verdünnungsreihe in THY-Medium und Ausplattieren auf THY-Agar (Lebendkeimzahlbestimmung) bestimmt werden (65).

2.8.2 Vorbereitung der Zellkultur

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die J774 trypsinisiert, auf eine Zellzahl von 500000 Zellen/ml eingestellt, und 1ml dieser Zellsuspension in jedes Well einer 12-Well-Kulturschale überführt.

2.8.3 Durchführung der Infektion

- Nach Entfernung des Überstandes aus den Wells der 12-Well-Gewebekulturplatte mit konfluentem Zellrasen konnte 1ml der 1:10 verdünnten Bakterienlösung zugesetzt werden (siehe oben).
- Der Ansatz wurde für 30 Minuten, 1h, 2h, 6h, 12h bzw. 24h bei 37°C und mit 5% CO₂ angereicherter Atmosphäre inkubiert.

2.8.4 Bestimmung von Adhärenz und Internalisierung im CFU-Assay

Adhärenz und Internalisierung

- Nach der jeweiligen Inkubationszeit (siehe Abschnitt 2.8.3) erfolgte die Entfernung des Mediums mit den nicht adhärenen Bakterien aus den Wells.
- Die eukaryoten Zellen wurden mit 1ml PBS gewaschen.
- Das Ablösen der eukaryoten Zellen aus den Vertiefungen erfolgte mit 500µl Trypsin und Inkubation der Platten für 10 Minuten bei 37°C. Um die Makrophagen vollständig abzulösen, wurden 500µl DMEM zugegeben und die Zellen mit dem Zellschaber vom Boden des Wells geschabt.
- Dann konnten die abgelösten, infizierten Zellen mitsamt den adhärenen und internalisierten Bakterien in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert werden.
- Die Zellen wurden bei 16060 g für 1 Minute sedimentiert und zur Lyse der eukaryoten Zellen in 1ml Aqua dest. resuspendiert. Diese Ansätze wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und währenddessen und danach zur vollständigen Lyse der eukaryoten Zellen für einige Sekunden gevortext. Die Streptokokken werden durch die Behandlung mit Aqua dest. nicht beeinträchtigt.
- Die so freigesetzten adhärenen und internalisierten Bakterien wurden mittels Lebendkeimzahlbestimmungen quantifiziert (siehe Abschnitt 2.8.1).

Internalisierung

- Zur anschließenden Bestimmung der Anzahl der internalisierten Bakterien wurde das Medium nach initialer 1-stündiger bzw. 2-stündiger Ko-Inkubation abgezogen, durch 1ml frisches Medium mit einem Antibiotikaanteil von 1% (5000 U/ml Penicillin, 5000µg/ml Streptomycin) ersetzt und dann für weitere 4, 10 bzw. 22 Stunden inkubiert.
- Am Ende der Ko-Inkubationszeit wurde das Medium abgezogen und die Zellen, wie bei der Bestimmung der adhärenen Bakterien beschrieben, aufgearbeitet.

Zusätzlich erfolgte zu jedem Versuchszeitpunkt die Zählung der lebenden und toten eukaryoten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben.

2.9 Infektionsversuche von Mono Mac 6 mit *S. pyogenes*

2.9.1 Vorbereitung der einzusetzenden Streptokokken

Die Vorbereitung der Bakterien erfolgte mit wenigen Modifikationen wie bei den J774.

- Nach den Waschschritten mit PBS wurden die Bakterien in 10ml RPMI-Medium aufgenommen und auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt.
- Diese Lösung wurde im Gegensatz zu dem Vorgehen bei den Mausmakrophagen mit RPMI-Medium um den Faktor 5 verdünnt.
- Für den Internalisierungsassay wurde die in einer Suspension dieser Konzentration enthaltene Zahl teilungsfähiger Zellen (colony forming units, CFU) bei jedem Versuch mittels einer Verdünnungsreihe in THY-Medium und Ausplattieren auf THY-Agar (Lebendkeimzahlbestimmung) bestimmt (siehe Abschnitt 2.8.1).

2.9.2 Vorbereitung der Zellkultur

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Mono Mac 6 auf eine Zellzahl von 1200000 Zellen/ml eingestellt und 0,5ml dieser Zellsuspension in jedes Well einer 12-Well-Kulturschale überführt. Somit enthielt jedes Well 600000 Zellen.

2.9.3 Bestimmung der notwendigen Antibiotikakonzentration für den Infektionsversuch

Bei dieser Zelllinie besteht nicht die Möglichkeit, den Überstand mit den darin enthaltenen, nicht adhärierten überschüssigen Bakterien abzunehmen und gegen neues, antibiotikahaltiges Medium zu ersetzen, da die eukaryoten Zellen zusammen mit den Bakterien im Medium schwimmen. Daher müssen die Antibiotika unverdünnt zum Versuchsansatz dazugegeben werden. Um die

Material und Methoden

geeignete Menge an Antibiotika zu bestimmen, wurde folgender Versuch durchgeführt:

Es wurde eine Bakterienkultur des Stammes M3 wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben vorbereitet und an dieser Ausgangslösung eine Lebendkeimzahlbestimmung durchgeführt. 1ml der Bakteriensuspension wurde in 12 Wells gegeben. In die Wells wurden 10µl, 20µl bzw. 50µl an Penicillin/Streptomycin zugegeben. Bei einem Well je Versuchszeitpunkt wurde kein Antibiotikum hinzugefügt. Nach 30 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden wurde die Zahl der viablen Bakterien in den Wells mit der Lebendkeimzahlbestimmung, wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben, bestimmt.

2.9.4 Durchführung der Infektion

- In die Vertiefungen einer 12-Well-Gewebekulturplatte mit den humanen Monozyten wurden je 0,5 ml der oben erwähnten Bakterienlösung gegeben.
- Der Ansatz wurde für 2h, 4h bzw. 8h bei 37°C und mit 5% CO₂ angereicherter Atmosphäre inkubiert.

2.9.5 Bestimmung von Adhärenz und Internalisierung im CFU-Assay

Adhärenz

Aufgrund der Tatsache, dass die humanen Monozyten Suspensionszellen sind, ist lediglich eine Bestimmung der Internalisierung möglich. Bei einfachem Ausstreichen der Lösung würden nicht nur die adhären und internalisierten Bakterien, sondern auch die nicht-adhären Streptokokken in der Lösung mitbestimmt. Daher konnte die Adhärenz nicht quantifiziert werden.

Internalisierung

- Zur Quantifizierung der internalisierten Bakterien wurden dem Medium nach initialer 1-stündiger Ko-Inkubation 50µl unverdünntes Antibiotikum (5000 U/ml Penicillin, 5000 µg/l Streptomycin), entsprechend einer 5%igen Lösung, zugefügt und dann für 1 bzw. 3 oder 7 weitere Stunden inkubiert.

Material und Methoden

- Zur Bestimmung der internalisierten Bakterien wurde nach der jeweiligen Inkubationszeit das Medium mit den sich darin befindlichen Monozyten abgezogen und in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert.
- Die Zellen wurden bei 16060 g für 1 Minute sedimentiert und zur Lyse der eukaryoten Zellen in 1ml aqua dest. resuspendiert. Diese Ansätze wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zwischendurch und danach zur vollständigen Lyse für einige Sekunden auf dem Schüttler durchmischt.
- Die so freigesetzten internalisierten Bakterien wurden mittels Lebend-Keimzahlbestimmungen quantifiziert.

Bei den humanen Monozyten erfolgte ebenfalls zu jedem Versuchszeitpunkt die Zählung der lebenden und toten eukaryoten Zellen in der Neubauerzählkammer (siehe Abschnitt 2.6.1).

2.10 Doppelimmunfluoreszenzversuche J774

Das Prinzip der Doppelimmunfluoreszenz ermöglicht die getrennte Anfärbung von intrazellulär und extrazellulär lokalisierten Bakterien durch spezifisch gegen Streptokokken gerichtete Antikörper. Zunächst wird ein polyklonaler gegen Gruppe-A-Streptokokken gerichteter Antikörper auf die auf Deckgläschen fixierten, infizierten Zellen gegeben. Dieser heftet sich nun an die extrazellulär befindlichen Streptokokken. Anschließend wird ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Antikörper zugegeben, der den Anti-A-Streptokokken-Antikörper erkennt. Nachdem die eukaryoten Zellen mit Triton X permeabilisiert wurden, erfolgt nach gleichem Prinzip die Färbung der intrazellulären Bakterien, mit dem Unterschied, dass jetzt ein Antikörper verwendet wird, der mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Aufgrund dieser beiden, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörper lassen sich die extra- und intrazellulär lokalisierten Streptokokken im Fluoreszenzmikroskop differenzieren.

2.10.1 Vorbereitung der Infektion

- Die Vorbereitung der Bakterien erfolgte in gleicher Weise wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben.
- 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die J774 trypsinisiert, auf eine Zellzahl von 300000 Zellen/ml eingestellt, und 1ml dieser Zellsuspension in jedes Well einer 24-Well-Kulturschale überführt. In jedem Well wurde vorher ein sterilisiertes Deckgläschen platziert, so dass die J774 auf diesem adhärerten.

2.10.2 Durchführung der Infektion mit *S. pyogenes*

- Aus den Wells der 24-Well-Gewebekulturplatte mit konfluentem Zellrasen wurde der Überstand entfernt und durch 1ml der bereits beschriebenen Bakterienlösung ersetzt (siehe Abschnitt 2.8.2 und 2.8.3).
- Dann folgte die Inkubation des Ansatzes für 30 Minuten, 1h und 2h bei 37°C und mit 5% CO₂ angereicherter Atmosphäre.

2.10.3 Durchführung der Färbung

- Nach Abnehmen des Überstandes und vorsichtigem, 1maligem Spülen mit 1ml PBS, folgte die Fixierung der Zellen mit 300µl 3%igem Paraformaldehyd für 15 Minuten bei 4°C.
- Nach Entfernen des Überstandes wurden 300µl 1%ige FCS-Lösung zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Markierung der extrazellulären Gruppe-A-Streptokokken

- Das FCS wurde abgezogen, jede Kavität 3mal mit 1ml 1xPBS gespült und 300µl eines gegen Gruppe-A-Streptokokken gerichteten Kaninchen-Antikörpers mit einer Konzentration von 1,2µg/ml für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Dieser Antikörper bindet an alle extrazellulär befindlichen Streptokokken.
- Nach einer Stunde wurde der Überstand abgenommen, jedes Well wiederum 3mal mit 1ml 1xPBS gespült und 300µl eines Ziegen-Antikörpers in einer Konzentration von 4µg/ml zugegeben. Dieser mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Alexa Fluor 488) versehene Antikörper bindet an den ersten Antikörper.

Material und Methoden

- Dieser Ansatz wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.
- Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und jedes Well 3mal mit PBS gespült.

Markierung der intrazellulären Gruppe-A-Streptokokken

- Die eukaryoten Zellen wurden mit 300µl einer 0,1%igen Tritonlösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und damit permeabilisiert.
- Nach 3maligem Spülen mit 1ml PBS wurden nochmals 300µl des 1. Antikörpers in jedes Well gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.
- Nun konnten die intrazellulär befindlichen Bakterien nach dem gleichen Prinzip, aber mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekennzeichnet werden. Es wurde ein zweiter, gegen den ersten Antikörper gerichteter Antikörper (Konzentration 4µg/ml) für 35 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln zugegeben. Dieser Antikörper war mit Alexa Fluor 647 markiert. Somit war fluoreszenzmikroskopisch eine Unterscheidung von intrazellulären und extrazellulären Bakterien möglich.
- Nach 35 Minuten wurde dem Überstand jedes Wells DAPI zugesetzt, um die Zellkerne anzufärben. Die DAPI-Stammlösung (1mg/ml) wurde 1:1000 verdünnt und 50µl dieser Verdünnung in jedes Well gegeben.

Fixierung der Deckgläschen für die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

- Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde der Überstand abpipettiert und jedes Well 1mal mit 1ml PBS gespült.
- Die Deckgläschen, auf denen sich die mit Gruppe-A-Streptokokken infizierten, nun angefärbten Mausemakrophagen befanden, wurden vorsichtig aus den Wells gehoben und einige Minuten an der Luft getrocknet.
- Es wurde circa 1µl Mounting Medium auf einen Objektträger aufgebracht. Darauf wurde die Seite des Deckgläschens, auf der sich die fixierten Zellen befanden, auf das Mounting Medium gelegt und vorsichtig festgedrückt.
- Um ein Eintrocknen der gefärbten Präparate zu verhindern, wurde der Rand des Deckgläschens mit Nagellack umschlossen.

- Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher Vergrößerung. Es wurden 3 Gesichtsfelder bewertet.

2.11 Doppelimmunfluoreszenzversuche Mono Mac 6

Die Trennung von extrazellulären und intrazellulären Bakterien bei den humanen Monozyten ist auch durch die Doppelimmunfluoreszenz nicht möglich, da die adhärennten Bakterien nicht von den frei im Medium schwimmenden, extrazellulären Streptokokken getrennt werden können. Die extrazellulären Bakterien werden nach einer Stunde Inkubationszeit durch Zugabe von Antibiotikum abgetötet. Daher entfällt der Färbeschritt für die außerhalb der eukaryoten Zellen befindlichen Bakterien.

2.11.1 Vorbereitung der Infektion

- Die Vorbereitung der Bakterien erfolgte in gleicher Weise wie unter 2.9.1 beschrieben.
- Direkt vor der Infektion wurden die eukaryoten Zellen bei 868 g für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellzahl auf 1000000/ml eingestellt. Die Zellen wurden in RPMI-Medium ohne Antibiotika-Zusatz aufgenommen.
- 0,5ml dieser Zellsuspension wurden in jedes Well einer 12-Well-Kulturschale überführt. Somit enthielt jedes Well 500000 Zellen.

2.11.2 Durchführung der Infektion mit *S. pyogenes*

- Die Infektion wurde durchgeführt wie in Abschnitt 2.9.4 beschrieben. Allerdings wurden lediglich 500000 Zellen, aufgenommen in 0,5 ml Medium, in jedes Well eingesetzt.
- Zusätzlich wurden 1 Stunde nach Beginn der Inkubationszeit 50µl Penicillin/Streptomycin in jedes Well gegeben.

2.11.3 Zentrifugation der infizierten Zellen

Um die Suspensionszellen färben zu können, müssen diese zunächst auf den Deckgläschen fixiert werden. Dies erfolgte mittels Zytozentrifugation. 200µl der infizierten Zellsuspension (entspricht 100000 Zellen) wurden mit Hilfe einer Zytozentrifuge bei 3000 rpm für 1 Minute auf Deckgläschen zentrifugiert. Diese Deckgläschen wurden zuvor 30 Minuten mit Polylysin behandelt, um eine bessere Haftung der Zellen an der Glasoberfläche zu ermöglichen. Die Deckgläschen wurden in die Wells einer 24-Well-Gewebekulturplatte überführt und mit PBS bedeckt. Bis zur Färbung wurde die Platte auf Eis gestellt.

2.11.4 Durchführung der Färbung

Prinzipiell geht man bei der humanen Zelllinie ebenso vor wie bei der murinen. Wie bereits erwähnt, konnten jedoch nur die intrazellulären Streptokokken angefärbt werden. Dadurch entfielen einige Schritte.

- Nach Verwerfen des Überstandes wurde vorsichtig einmal mit 1ml PBS gespült. Als Nächstes erfolgte die Fixierung der Zellen mit 300µl 3%igem Paraformaldehyd für 15 Minuten bei 4°C.
- Nach dem Entfernen des Überstandes schloss sich die Inkubation mit 300µl 1%iger FCS-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur an.
- Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 300µl Triton X (0,1%) für 5 Minuten bei Raumtemperatur.
- Die Markierung der intrazellulären Bakterien und die weitere Vorgehensweise wurde anschließend genauso wie in Abschnitt 2.10.3 beschrieben durchgeführt.

2.12 Lebend/Tot-Färbung für Bakterien

Diese Methode dient der Feststellung des Verhältnisses von lebenden und toten Bakterien innerhalb der eukaryoten Zelle. Hierzu wurde das „Bacterial Viability Kit“ von Molecular Probes verwendet. Ein Farbstoff (SYTO 9) färbt sowohl Bakterien mit intakter als auch mit beschädigter Zellmembran. Ein zweiter Farbstoff

(Propidiumiodid) penetriert nur Bakterien mit beschädigter Zellmembran, was eine Reduktion der SYTO 9-Fluoreszenz bewirkt und eine Unterscheidung von lebenden und toten Bakterien ermöglicht. Bakterien mit intakter Zellmembran werden grün, Bakterien mit beschädigter Zellmembran rot gefärbt.

Die Zellen wurden wie bereits beschrieben mit den verschiedenen GAS-Stämmen infiziert. Nach Inkubation wurden die eukaryoten Zellen mit Wasser lysiert und damit die intrazellulären Bakterien freigesetzt. Die Bakterien konnten dann mit einem Kit gefärbt werden.

2.12.1 Mausmakrophagen J774

Vorbereitung und Durchführung der Infektion

Die Vorbereitung der Bakterien und Mausmakrophagen erfolgte in gleicher Weise wie in Abschnitt 2.8.1 und 2.8.2 beschrieben. Es wurden jedoch 600000 eukaryote Zellen/ml am Vortag eingesetzt.

Die Durchführung der Infektion glich ebenfalls weitestgehend dem in Abschnitt 2.8.3 beschriebenen Ablauf. Die Inkubationszeit der Ansätze betrug allerdings nur 30 Minuten, 1h bzw. 2h (37°C, 5% CO₂).

Durchführung der Färbung

Die eukaryoten Zellen wurden wie in Abschnitt 2.8.4 beschrieben vom Untergrund des Wells abgelöst.

- Die Zellsuspension wurde in Eppendorfgefäße überführt, 5 Minuten bei 3421 g zentrifugiert und der Überstand entfernt.
- Um die Zellmembranen zu zerstören und die intrazellulären Bakterien freizusetzen, erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 1ml Aqua dest. und vorsichtige Auflösung mit der Pipette. Auf vortexen wurde verzichtet, um eventuell beschädigte Bakterien nicht zu zerstören.
- Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (5 Minuten, 1521 g) konnte der Überstand verworfen werden.
- Die Färbung erfolgte mit dem Bacterial Viability Kit:
- Nach guter Vermischung gleicher Anteile von Component A und B und Zugabe von 3 µl dieses Gemisches zu 1ml PBS, wurde das Zellpellet in 100µl dieser

Lösung aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

- Nach Applikation von circa 1µl dieser Zellsuspension auf einen Objektträger, konnte dieser mit einem Deckgläschen bedeckt und mit Nagellack abgedichtet werden.
- Anschließend erfolgte die Bestimmung der Anzahl der lebenden und toten Bakterien bei 600facher Vergrößerung.

2.12.2 Humane Monozyten Mono Mac 6

Vorbereitung und Durchführung der Infektion

Die Vorbereitung der Bakterien und humanen Monozyten erfolgte in gleicher Weise wie in Abschnitt 2.11.1 beschrieben. Die Durchführung der Infektion glich dem in Abschnitt 2.11.2 beschriebenen Ablauf.

Durchführung der Färbung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Inhalt jedes Wells in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Eine Ablösung der Zellen war bei dieser Zelllinie nicht notwendig. Es wurde weiterverfahren wie in Abschnitt 2.12.1 beschrieben.

2.13 Differenzierung von Mono Mac 6 in Makrophagen

In der Literatur wird für andere Monozyten-Zelllinien die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen beschrieben. Eine Möglichkeit hierfür stellt eine Behandlung der Zellen mit Phorbol ester dar. Die für die Differenzierung benötigte Menge dieser Chemikalie war allerdings nicht bekannt.

Um die Differenzierung zu etablieren, wurden also zunächst Vorversuche dazu durchgeführt.

2.13.1 Vorbereitung der eukaryoten Zellen

Am Versuchstag wurden je 600000 Zellen, aufgenommen in 0,5ml RPMI-Medium, in die Wells eingebracht.

2.13.2 Herstellung der Phorbolesterlösung

Die Phorbolesterstammlösung (1mg/ml = 1620nM) lag in DMSO gelöst, eingefroren bei -20°C, vor.

In mehreren Versuchen wurden verschiedene Stoffmengen an Phorbolster an den humanen Monozyten getestet. Diese wurden zuvor in Verdünnungsreihen hergestellt. Es wurden Versuche mit 50nM, 25nM, 12,5nM, 12nM, 6,25nM, 6nM, 3nM, 1,5nM, 0,75nM, 0,375nM, 0,375nM, 0,1875nM und 0,09375nM durchgeführt.

2.13.3 Durchführung der Differenzierungsversuche

Je 0,5ml der vorbereiteten Phorbolesterlösungen und der Zellsuspension wurden in 1 Well gegeben. An 3 aufeinanderfolgenden Tagen wurden die lebenden und toten Zellen im Überstand gezählt. Die adhären Zellen wurden mit 500µl Trypsin und anschließender Inkubation der Platten für 10 Minuten bei 37°C abgelöst, dann wurde mit 0,5ml RPMI-Medium auf 1ml aufgefüllt und die Zahl der lebenden und toten eukaryoten Zellen bestimmt. Die Zahl der adhären und nichtadhären Zellen wurde zur Beurteilung des Erfolgs ins Verhältnis gesetzt.

Nach 48 Stunden wurde der Überstand mit dem Phorbolester und den bisher nicht adhären Zellen abgenommen und gegen übliche RPMI-Medium mit 1% Antibiotikum ersetzt. Dies war nötig, da Phorbolester bei längerem Einwirken toxisch auf die eukaryoten Zellen wirkt.

2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels dem Computerprogramm GraphPad Prism3. Die Signifikanz der Daten wurde mit dem ungepaarten t-Test bestimmt. Alle Daten mit einem p-Wert < 0,05 wurden als signifikant unterschiedlich bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 *Mausmakrophagen J774*

3.1.1 Wachstumsverhalten der J774

Von beiden verwendeten eukaryoten Zelllinien wurde zunächst das Wachstumsverhalten untersucht.

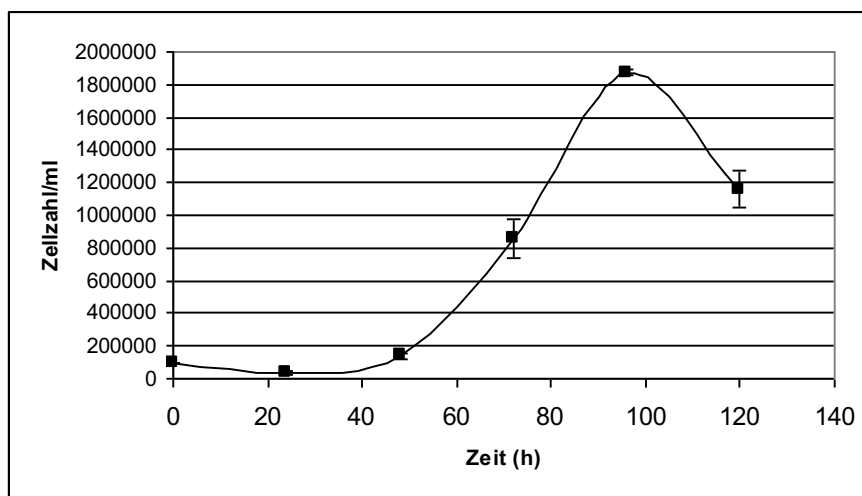


Abbildung 2:

Wachstumsreihe J774 Es wurden 100000 Zellen/ml in ein Well eingesäht und die Entwicklung der Zahl der eukaryoten Zellen über 5 Tage beobachtet. Dieser

Kurve liegen die Mittelwerte von 2 unabhängigen Versuchen zugrunde. Bei jedem Versuch wurden die Zellen von mindestens 2 Wells ausgezählt.

Die Kurve (Abbildung 2) zeigt zunächst einen Abfall der Zellzahlen, gefolgt von einem linearen Anstieg nach 48 Stunden, der bis 96 Stunden nach Versuchsbeginn bei ca. 1800000 Zellen/ml endet. Das entspricht einer Verdopplungszeit von 16,3 Stunden. Auffällig ist das Fehlen einer stationären Phase, daher wurden die nachfolgenden Versuche in der linearen Wachstumsphase durchgeführt.

Für die Adhärenz- und Internalisierungsversuche wurden am Vortag 500000 Zellen/ml in jedes Well eingesetzt, für die Doppelimmunfluoreszenz 300000 Zellen/ml und für die Lebend/Tot-Färbung 600000 Zellen/ml.

3.1.2 Phagozytoseassay

Bei den J774 handelt es sich um Mausmakrophagen. Sowohl Monozyten als auch Makrophagen sind, wie bereits in der Einleitung dargestellt, phagozytotisch aktive Zellen. Das bedeutet, dass es für Bakterien mehrere Möglichkeiten gibt, in das Innere der eukaryoten Zelle zu gelangen: 1. durch aktives Eindringen des Bakteriums in die Zelle (wie z.B. *E. coli* bei Urothelzellen), 2. durch passive gerichtete Aufnahme des Bakterium durch die phagozytierenden Zellen, 3. durch Initiierung der Aufnahme der Bakterien durch Aktivierung eines Signalwegs in den Phagozyten (wie z.B. GAS bei HEp2-Zellen).

Es wurde also in Experimenten die phagozytäre Aktivität (% der phagozytierenden Zellen von allen potentiellen Phagozyten) und der Phagozytose-Index (Zahl der aufgenommenen Partikel in einer phagozytierenden Zelle) dieser Zelllinie untersucht (59).

Es wurden Latexbeads mit einer Größe von 1µm verwendet, was in etwa mit der Größe von GAS-Ketten übereinstimmt (75).

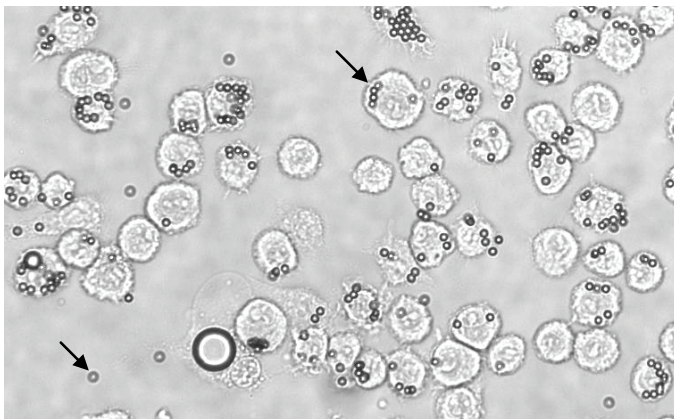


Abbildung 3: Phagozytoseassay

J774 Das übliche Medium der Mausmakrophagen wurde für 1h mit Medium ausgetauscht, das inerte Latexbeads enthält. Nach 1h wurde dieses Medium abgenommen und die Zellen unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Die hier fotografierten Zellen wurden auf

einem Deckgläschen angezüchtet. Die kleiner erscheinenden, monomorphen Partikel sind Latexbeads (Pfeile), die sich größtenteils in den eukaryoten Zellen befinden. Es wurden mindestens 200 Zellen pro Versuch ausgewertet. Vergrößerung 600x.

Insgesamt waren 83% der Zellen phagozytotisch aktiv. In den phagozytotisch aktiven Zellen befanden sich durchschnittlich 3,8 Latexbeads je Zelle (Abbildung 3).

Ergebnisse

3.1.3 *S. pyogenes* Adhärenz an und Internalisierung in J774-Makrophagen

Bestimmung internalisierter *S. pyogenes* mittels CFU-Assay

Im CFU-Assay wurde die Zahl der extra- und intrazellulären Bakterien für die Zeitpunkte 0,5h, 1h, 2h, 6h, und 12h post infectionem (p.i.) bestimmt. Für den Serotyp M49 und die von ihm abstammende Mutante Δ *fasX* wurden auch Werte 24h p.i. ermittelt.

Für 0,5h und 1h p.i. wurden adhärenzte und internalisierte Bakterien zusammen ermittelt, ab 2h p.i. umfassen die Werte nur die intrazellulär gelegenen Bakterien. Dies ist durch den Versuchsaufbau bedingt.

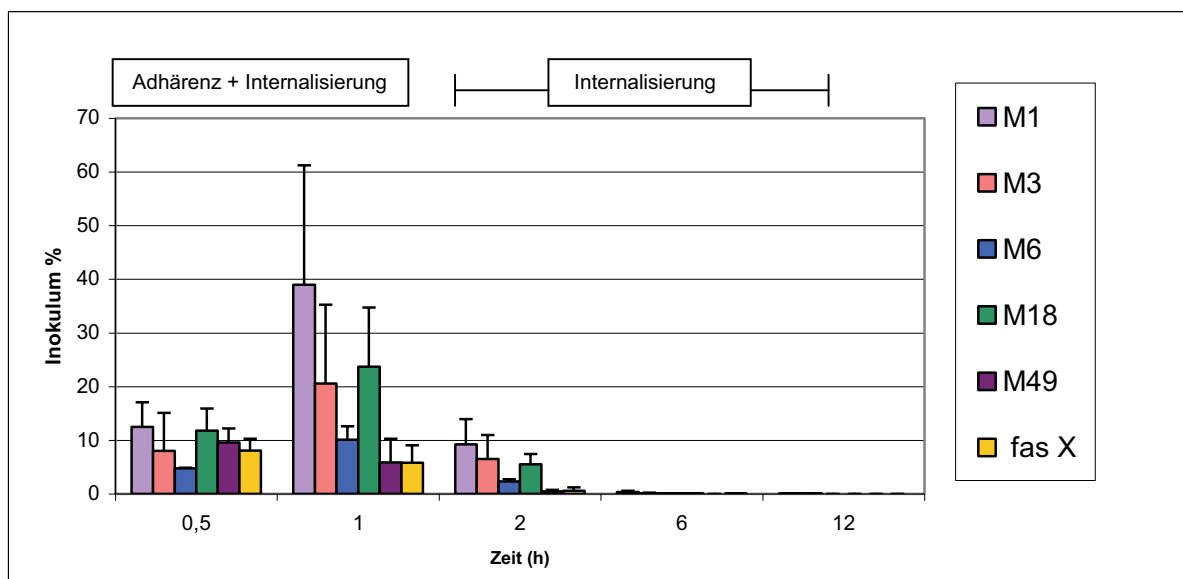


Abbildung 4: Adhärenz und Internalisierung verschiedener A-Streptokokken-Serotypen an J774 im CFU-Assay Es wurde erfasst, wieviel Prozent der zu Versuchsbeginn zugebenen Bakterien (Inokulum) sich nach dem jeweils angegebenen Zeitraum an bzw. in den Zellen befanden. Die dargestellten Ergebnisse für jeden Serotyp stellen Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Einzelwerten dar.

Die höchsten Werte für Adhärenz und Internalisierung wurden 1h post infectionem erreicht (Abbildung 4). Die Werte der Serotypen M1, M3, M6 und M18 stiegen nach 30 Minuten zu 1 Stunde noch teilweise beträchtlich an, die Werte des Serotyps M49 und der korrespondierenden Mutante Δ *fasX* sanken kontinuierlich

Ergebnisse

ab. Ab 6h p.i. konnten bei keinem Serotypen nennenswerte Zahlen von viablen, noch zur Teilung fähigen intrazellulären Bakterien in den J774-Makrophagen gefunden werden.

Trotz hoher Standardabweichung liegt ein signifikanter Unterschied zwischen M1 und M49 sowie der Mutante $\Delta fasX$ 1h und 2h p.i. vor.

Es sind 2 Gruppen charakterisierbar:

1. M1, M3, M18 mit relativ hohen Werten: 20-40% des Inokulum waren nach 1h adhäriert bzw. internalisiert.
2. M6, M49, $\Delta fasX$ mit niedrigeren Werten.

Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind auch über den Verlauf erkennbar.

Zu Versuchsbeginn sowie zu jedem Zeitpunkt wurde die Anzahl der lebenden und toten Makrophagen bestimmt. Allgemein lag der Anteil der toten Zellen schon zu Versuchsbeginn bei dieser Zelllinie relativ hoch, durchschnittlich 39,04%.

Tabelle 1 gibt den Anteil der lebenden eukaryoten Zellen an der Gesamtzahl der eukaryoten Zellen zu jedem Zeitpunkt wieder. Die angegebenen Werte ergeben also mit dem äquivalenten Wert für die toten Zellen 100%.

Bei allen Versuchen war anfänglich der Anteil der lebenden Phagozyten relativ niedrig. Zu Beginn bis etwa 2 Stunden nach Versuchsbeginn fiel der Anteil der lebenden J774-Zellen weiter ab. Ab diesem Zeitpunkt schienen sich die Zellen zu erholen und wieder zu proliferieren. Der Anteil der lebenden Phagozyten stieg über das Ausgangsniveau. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Serotypen.

Die Entwicklung des Anteils der toten Phagozyten verhielt sich spiegelbildlich zu dem der lebenden Makrophagen. Zunächst stieg der Anteil, um dann auf ein Niveau unter dem Ausgangswert zu sinken. Eine Ausnahme stellt M3 dar, hier fiel der Anteil der toten Zellen während des gesamten Verlaufes nicht unter den Ausgangswert.

Ergebnisse

	lebende J774			tote J774	
M1	Mittelwert in %	Stabw. in %		Mittelwert in %	Stabw. in %
0h	67,4	2,4		33,0	2,4
30 min	72,0	3,1		28,0	3,1
1h	62,3	9,6		37,7	9,6
2h	66,1	4,9		33,9	4,9
6h	69,0	10,5		31,0	10,5
12h	79,7	3,1		20,3	3,1
M3	Mittelwert in %	Stabw. in %		Mittelwert in %	Stabw. in %
0h	67,4	2,4		33,0	2,4
30 min	57,1	2,8		42,9	2,8
1h	58,3	9,3		41,7	9,3
2h	53,1	9,0		46,9	9,0
6h	64,5	9,4		35,5	9,4
12h	67,4	1,6		32,6	1,6
M6	Mittelwert in %	Stabw. in %		Mittelwert in %	Stabw. in %
0h	61,5	4,7		38,5	4,7
30 min	45,2	4,0		54,8	4,0
1h	66,3	6,7		33,7	6,7
2h	55,2	8,5		44,8	8,5
6h	77,5	8,4		22,5	8,4
12h	79,1	10,8		20,9	10,8
M18	Mittelwert in %	Stabw. in %		Mittelwert in %	Stabw. in %
0h	61,5	4,7		38,5	4,7
30 min	58,8	9,8		41,2	9,8
1h	54,0	8,0		46,0	8,0
2h	55,1	0,3		44,9	0,3
6h	75,5	8,2		24,5	8,2
12h	74,5	6,6		25,5	6,6
M49	Mittelwert in %	Stabw. in %		Mittelwert in %	Stabw. in %
0h	58,6	8,7		41,4	8,7
30 min	52,8	6,7		47,2	6,7
1h	53,3	9,1		46,7	9,1
2h	64,0	12,0		36,0	12,0
6h	64,1	8,7		35,9	8,7
12h	72,6	8,0		27,4	8,0
24h	72,5	9,1		27,5	9,1
Δ fasX	Mittelwert in %	Stabw. in %		Mittelwert in %	Stabw. in %
0h	58,6	8,7		41,4	8,7
30 min	50,8	7,3		49,2	7,3
1h	53,2	10,0		46,8	10,0
2h	59,4	11,8		40,6	11,8
6h	58,8	10,3		41,2	10,3
12h	76,1	13,5		23,9	13,5
24h	68,6	7,0		31,4	7,0

Tabelle 1: Entwicklung der Zahl der lebenden und toten eukaryoten J774 in % In dieser Tabelle ist der prozentuale Anteil der lebenden und toten eukaryoten Zellen an allen Zellen zu jedem Zeitpunkt wiedergegeben.

Ergebnisse

Bestimmung adhärenter und internalisierter *S. pyogenes* mittels Doppelimmunfluoreszenz

In der Doppelimmunfluoreszenz kann man die adhärenenten und internalisierten Bakterien mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markieren (Abbildung 5). Zusätzlich werden die Zellkerne der eukaryoten Zellen angefärbt, wodurch eine Zuordnung von angefärbten Bakterien und Phagozyten möglich ist. Die Zahl der adhärenenten Bakterien wurde auf die Bakterienzahl je 100 eukaryote Zellen hochgerechnet, um einen Vergleich der verschiedenen Stämme zu ermöglichen und die Anschaulichkeit der Ergebnisse zu verbessern.

Bei den Mausmakrophagen wurden die Zeitpunkte 0,5h, 1h und 2h p.i. untersucht, da bei diesen Zeitpunkten in den vorhergehenden Untersuchungen die deutlichsten Unterschiede gesehen wurden, während danach bis zu 24h post infectionem lediglich der Anteil der GAS sinkt.

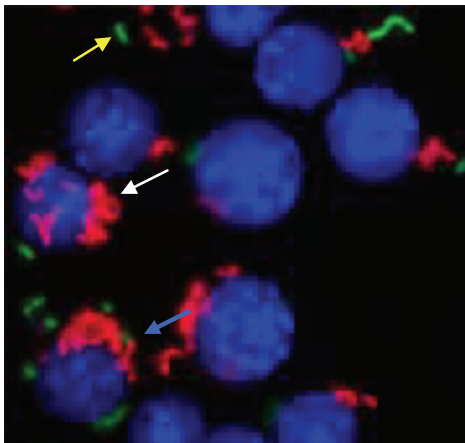


Abbildung 5: Doppelimmunfluoreszenz Die Abbildung zeigt den Serotyp M1 2 Stunden nach Infektion. Die Zellkerne der eukaryoten Zellen stellen sich blau dar. Die intrazellulären Bakterien sind rot gefärbt und in Haufen um den Zellkern gelagert (weißer Pfeil). Die grünen Ketten (gelber Pfeil) befinden sich extrazellulär und sind den Zellen angelagert. Transiente Bakterien sind ebenfalls abgebildet (blauer Pfeil).

Adhärenz:

Wie in Abbildung 6 veranschaulicht konnte bei allen GAS-Serotypen einen Anstieg der an die J774 adhärenenten Bakterien über die Zeit festgestellt werden. Nach 30 Minuten lassen sich noch keine signifikanten Unterschiede erkennen, nach 2h heben sich M1 und M6 von den anderen Serotypen durch eine höhere Adhärenz ab. Lediglich bei M18 stagniert die Adhärenz von 1h nach 2h. Weiterhin unterscheidet sich die Adhärenz von M3 und M6 signifikant.

Ergebnisse

Bei der Mutante $\Delta fasX$ steigt die Adhärenz eher verhalten an. Insgesamt zeigt $\Delta fasX$ die geringste Adhärenz nach 1h und 2h. Es ist auffällig, dass die Mutante in der Adhärenz im Zeitverlauf hinter M49 zurückbleibt, ein signifikanter Unterschied lässt sich aber nicht nachweisen.

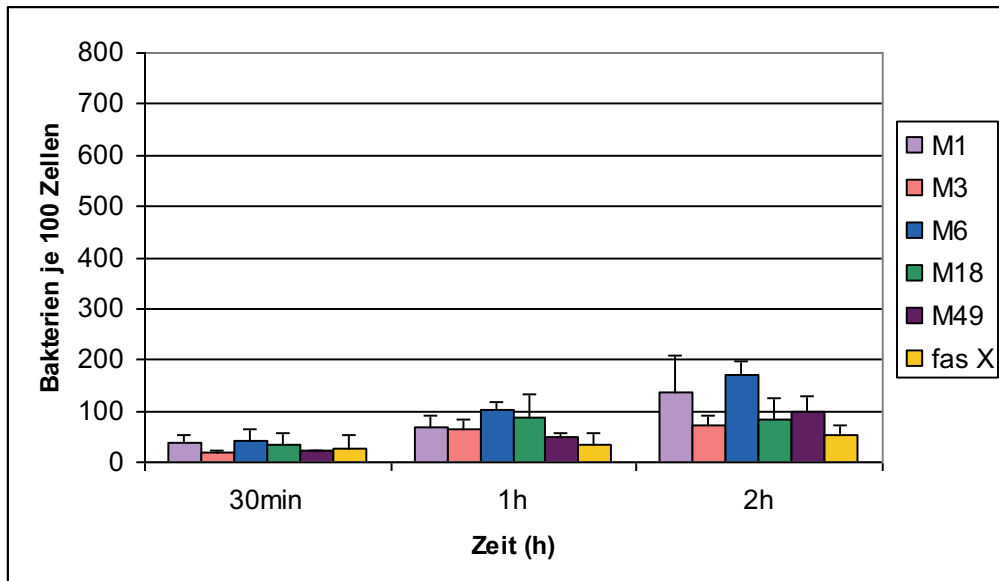


Abbildung 6: Adhärenz der untersuchten Streptokokken-Serotypen an J774 in der Doppelimmunfluoreszenz Die Adhärenz der GAS wurde mittels Doppelimmunfluoreszenz unabhängig von der Internalisierung bestimmt. Bei jedem Einzelversuch wurden in drei Gesichtsfeldern je die Zahl der adhärenzierten, internalisierten und transienten Bakterien sowie die Zahl der eukaryoten Zellen ausgezählt (Vergrößerung 1000x). Die Werte wurden hochgerechnet auf 100 eukaryote Zellen, um einen Vergleich der verschiedenen Versuche zu ermöglichen. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus mindestens 3 Einzelversuchen.

Internalisierung:

Auch die Internalisierung (Abbildung 7) nahm bei allen Serotypen von 0,5h nach 2h zu. Sie erreichte höhere Werte als die Adhärenz.

Bei $\Delta fasX$ war die Internalisierung zu allen Zeitpunkten am niedrigsten, bei dem Wildtyp M49 am höchsten. Zwischen diesen beiden Stämmen besteht für alle 3 Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied, der bereits bei Betrachtung der Doppelimmunfluoreszenzbilder erkennbar ist (Abbildung 9).

Ergebnisse

M18 zeigte ebenfalls geringeres Internalisierungsverhalten als die anderen untersuchten Wildtyp-Stämme. So war zu jeder Zeit ein signifikanter Unterschied zwischen M18 und M49 nachweisbar.

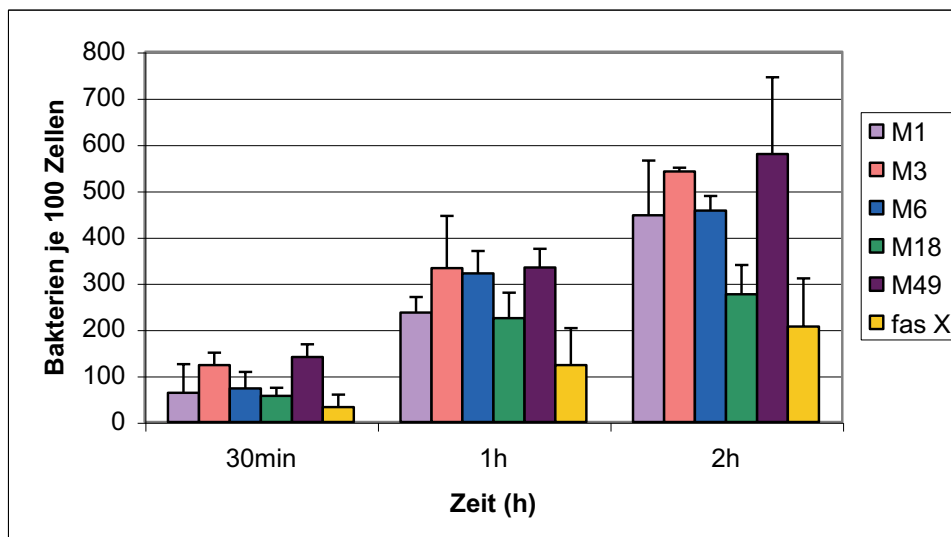


Abbildung 7: Internalisierung der untersuchten Streptokokken-Serotypen an J774 in der Doppelimmunfluoreszenz Bei jedem Einzelversuch wurden in drei Gesichtsfeldern je die Zahl der adhärenierten, internalisierten und transienten Bakterien sowie die Zahl der eukaryoten Zellen ausgezählt (Vergrößerung 1000x). Die Werte wurden ebenfalls auf 100 eukaryote Zellen hochgerechnet. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus mindestens 3 Einzelversuchen.

Transiente Bakterien:

Streptokokken bestehen aus mehreren Bakterien, die zu Ketten verbunden sind. Es ist möglich, dass ein Teil der Kokken einer Kette sich noch extrazellulär befindet, während die restliche Kette bereits intrazellulär lokalisiert ist. Dabei handelt es sich um sogenannte transiente Bakterien.

Der Anteil der transienten Bakterien stieg leicht im Zeitverlauf, war aber insgesamt relativ niedrig (Abbildung 8).

Ergebnisse

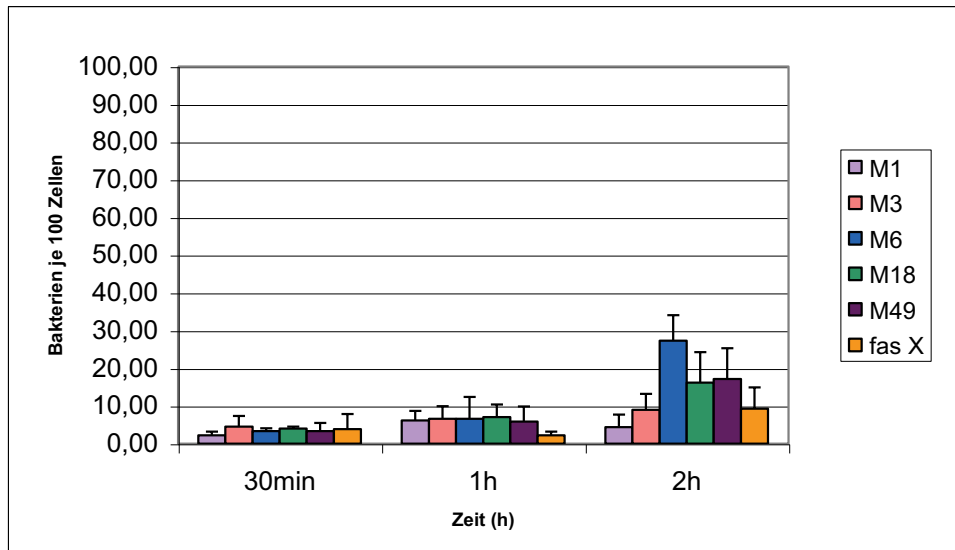


Abbildung 8: Transiente Bakterien in der Doppelimmunfluoreszenz

Dargestellt ist die Zahl der Streptokokkenketten je 100 Zellen, bei denen ein Teil der Kokken einer Bakterienkette extrazellulär lokalisiert ist, der andere Teil intrazellulär.

Die Relation von adhärenenten und internalisierten Bakterien wird in den Abbildungen 9 und 10 verdeutlicht.

Man erkennt die Unterschiede zwischen den Serotypen, insbesondere die Sonderrolle von Δ *fasX* im Vergleich zu M49. Auch M18 hebt sich von den anderen Wildtypen durch geringere Adhärenz und Internalisierung ab.

Bei allen Serotypen zu allen Zeitpunkten waren wesentlich mehr internalisierte Bakterien vorzufinden als adhärenente, der Anteil der internalisierten schwankte jeweils um 80%. Diese Daten waren bei der Betrachtung unter dem Mikroskop offensichtlich (Abbildung 9).

Ergebnisse

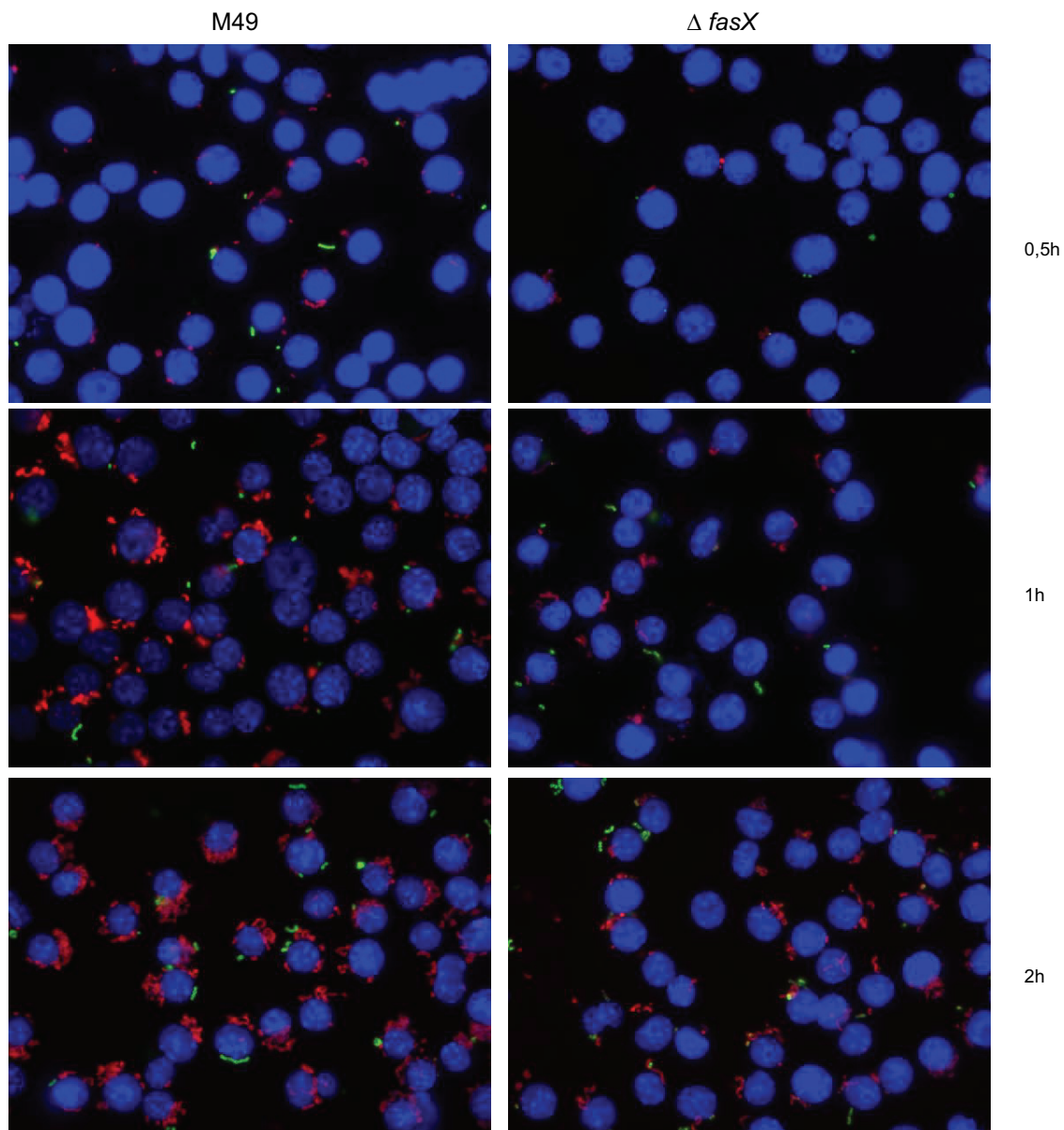


Abbildung 9: Doppelimmunfluoreszenz – Fotos der Stämme M49 und $\Delta fasX$ In dieser Abbildung ist ein direkter Vergleich von M49 und der M49- $\Delta fasX$ -Mutante nach 0,5h, 1h und 2h dargestellt. Die Zellkerne der eukaryoten Zellen wurden mit DAPI gefärbt und fluoreszieren blau. Die extrazellulär lokalisierten Bakterienketten fluoreszieren grün. Die intrazelluläre befindlichen Streptokokken, rot fluoreszierend, lagern sich in Haufen um die Zellkerne herum. 600x Vergrößerung.

Ergebnisse

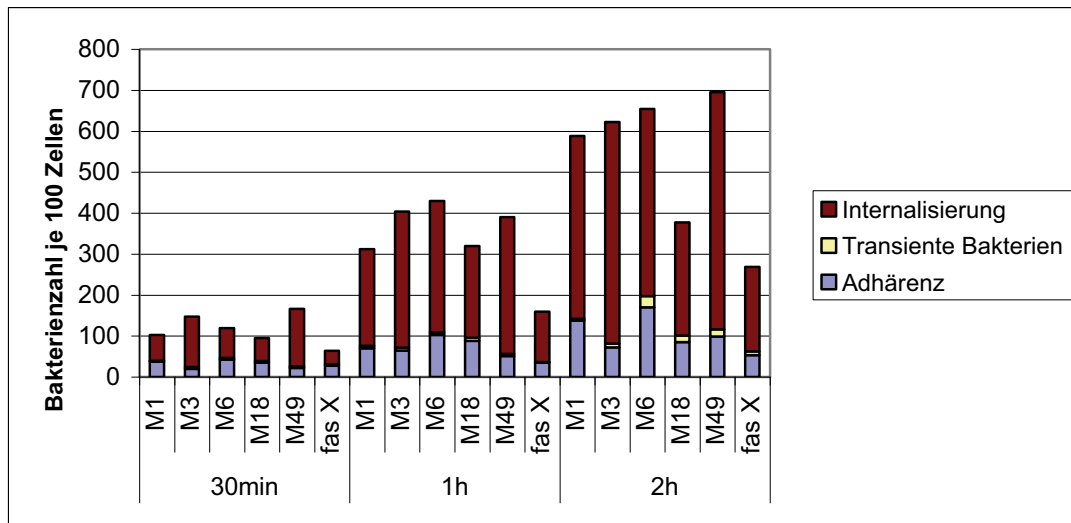


Abbildung 10: Adhärenz und Internalisierung der GAS-Serotypen bei J774 gestapelt

Die Einzelsäulen der Adhärenz und Internalisierung sind gestapelt dargestellt. Der Anteil der transienten Bakterien war nur gering.

3.1.4 Lebend/Tot-Färbung von *S. pyogenes* nach der Infektion von J774

Nach den bisher durchgeführten Versuchen war nun interessant, ob die in der DIF angefärbten Bakterien überhaupt noch leben. In den Internalisierungsversuchen nach Molinari wurden kaum vermehrungsfähige intrazelluläre Bakterien nachgewiesen, in der Doppelimmunfluoreszenz sah man jedoch viele intrazellulär akkumulierende Bakterien. Dieser scheinbare Widerspruch wurde in Publikationen so gedeutet (17), dass sich tote Bakterien in den Zellen anhäufen.

Die Doppelimmunfluoreszenz färbt alle Partikel an, die GAS-typische Oberflächen-Proteine besitzen, gleichgültig ob diese noch leben und sich vermehren können oder nicht. Das Adhärenz- und Internalisierungsassay weist nur die Bakterien nach, die in dem Moment noch zur Teilung fähig sind. Das Live/Dead-Kit, mit dem diese Färbung durchgeführt wurde, weist alle Bakterien mit noch intakter Zellmembran als lebend aus. Diese Methode sollte als Ergänzung zu dem bisherigen Methodenspektrum dienen, und den vermeintlichen Widerspruch aufklären.

Da jede Kette einer Streptokokkenkette für sich allein eine Lebensform darstellt, die Auswertung der Versuche aber der Einfachheit halber mittels Zählung ganzer

Ergebnisse

Ketten erfolgt, ergibt sich die Möglichkeit von gemischten Ketten aus lebenden und toten Kokken, diese wurden gesondert erfasst.

Die Färbung mit dem Live/Dead-Kit ergab im Wesentlichen einen mehr oder weniger konstanten Verlauf. Wesentlich ist das Verhältnis zwischen der Zahl der lebenden und toten Bakterien (Abbildung 11).

Der Anteil der lebenden Bakterien bei dieser Methode war bei allen Serotypen größer als der Anteil der toten Bakterien, schwankend um 60%. Die toten GAS-Ketten sowie die aus lebenden und toten Kokken bestehenden GAS-Ketten vereinigten jeweils circa 20% auf sich. Es sind zwar geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen Serotypen erkennbar, aus diesen lässt sich aber nicht auf generelle Unterschiede schließen, da diese Ergebnisse aus der Auswertung einer geringen Zahl von Bakterien stammen.

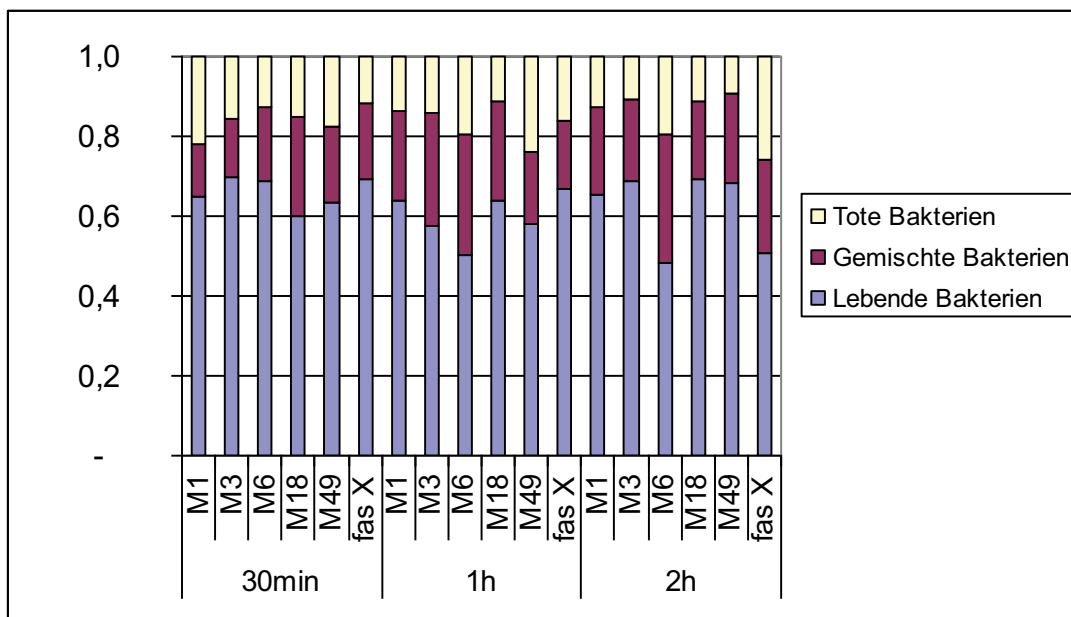


Abbildung 11: Prozentuale Anteile der sich als tot, lebend bzw. gemischt tot und lebenden darstellenden Bakterienketten J774 Es wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop in 3 Gesichtsfeldern die Zahl der lebenden, toten und gemischten Streptokokkenketten bestimmt (Vergrößerung 600x). Die Versuche wurden mindestens 3fach durchgeführt.

3.2 Humane Monozyten Mono Mac 6

3.2.1 Wachstumsverhalten der MM6

Im folgenden Experiment wurde das Wachstumsverhalten der humanen Monozyten untersucht.

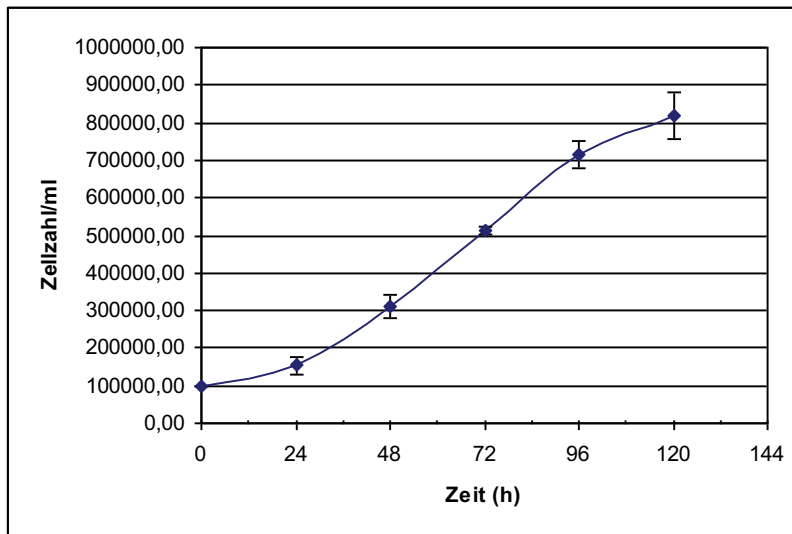


Abbildung 12:
Wachstumsreihe MM6

Es wurden 100000 Zellen/ml in ein Well eingesäht und die Entwicklung der Zahl der eukaryoten Zellen über 5 Tage beobachtet. Dieser Kurve liegen die Mittelwerte von 3 unabhängigen

Versuchen zugrunde. Bei jedem Versuch wurden die Zellen von mindestens 2 Wells ausgezählt.

Die humanen Monozyten zeigten ein langsames Wachstum, erkennbar an der Verdopplungszeit, die hier 35,4 Stunden betrug (Abbildung 12). Nach 5 Tagen verlangsamte sich das Wachstum. Zu diesem Zeitpunkt hätte auch ein Mediumwechsel erfolgen sollen, um die Plateauphase messen zu können. Der Mediumwechsel wiederum war nur unter großem Aufwand und mit Zentrifugation möglich, da es sich bei dieser Zelllinie um Suspensionszellen handelt. Deshalb wurde die Bestimmung des Wachstumsverhaltens nach 5 Tagen abgebrochen.

3.2.2 Phagozytoseassay

Auch für diese Zelllinie wurde mittels Latexbeads die phagozytäre Aktivität untersucht. Überraschenderweise konnte eine Aufnahme von inerten Latexbeads durch die Zelllinie MM6 nicht festgestellt werden (Abbildung 13). Der Versuch

Ergebnisse

wurde zweimal durchgeführt. Die geringere Zelldichte auf den Fotos wird durch die in Suspension schwimmenden Zellen vorgetäuscht.

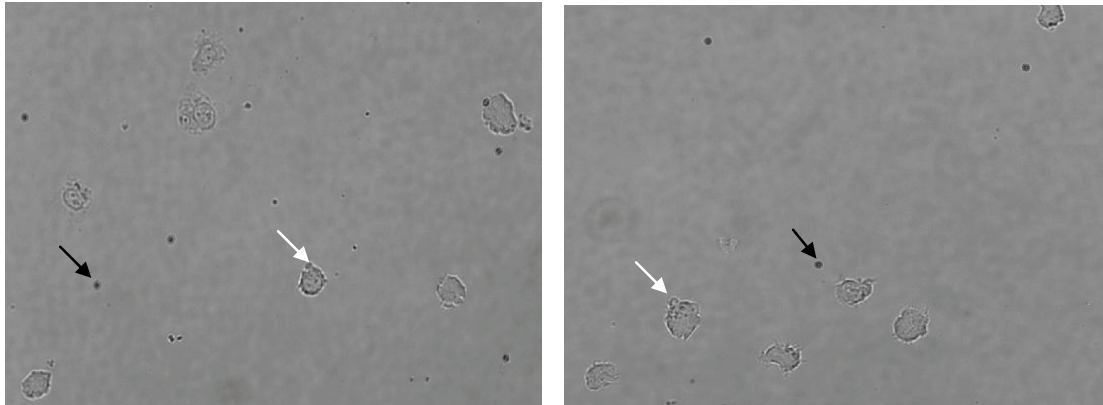


Abbildung 13: Phagozytoseassay MM6 Dem Medium der humanen Monozyten wurden Latexbeads zugesetzt. Nach 1h wurden die Wells auf Eis gestellt, um eine weitere Phagozytose zu verhindern. Die Zellen, die sich im Well abgesetzt hatten, wurden unter dem Lichtmikroskop betrachtet und zur Auswertung herangezogen. Es wurden mindestens 200 Zellen pro Versuch ausgewertet. Dieses Foto wurde anschließend von einer Probe desselben Ansatzes unter einem anderen Mikroskop angefertigt. Wenige Mikroliter wurden auf einen Objektträger gegeben, und mit einem Deckgläschen bedeckt. Das erklärt die geringe Zelldichte auf den Fotos. Die kleiner erscheinenden, monomorphen Partikel sind die Latexbeads (schwarze Pfeile). Die unregelmäßig geformten Zellen enthalten keine Latexbeads (weiße Pfeile). Vergrößerung 600x.

3.2.3 *S. pyogenes* Internalisierung in MM6-Monozyten

Ermittlung der Antibiotikakonzentration für ein Internalisierungsassay

Bei den murinen Makrophagen wurde das die Bakterien enthaltende Medium eine Stunde nach Versuchsbeginn gegen antibiotikahaltiges Medium (mit einem Antibiotikagehalt von 1%) ersetzt. Dieses Vorgehen war bei den humanen Monozyten nicht möglich, da diese zusammen mit den Streptokokken im Medium schwimmen.

Eine Stunde nach Versuchsbeginn mussten alle Bakterien zügig aus dem Medium entfernt werden. Bei den Monozyten musste dies durch Zugabe von Antibiotikum zum Ausgangsmedium anstatt durch Ersatz des Ausgangsmediums geschehen.

Ergebnisse

Da sich eine große Zahl von Bakterien in der Lösung befand, stellte sich die Frage, ob ein Antibiotikagehalt von 1% ausreichte. Aus diesem Grund wurde ein Versuch zur Feststellung des nötigen Antibiotikagehalts durchgeführt.

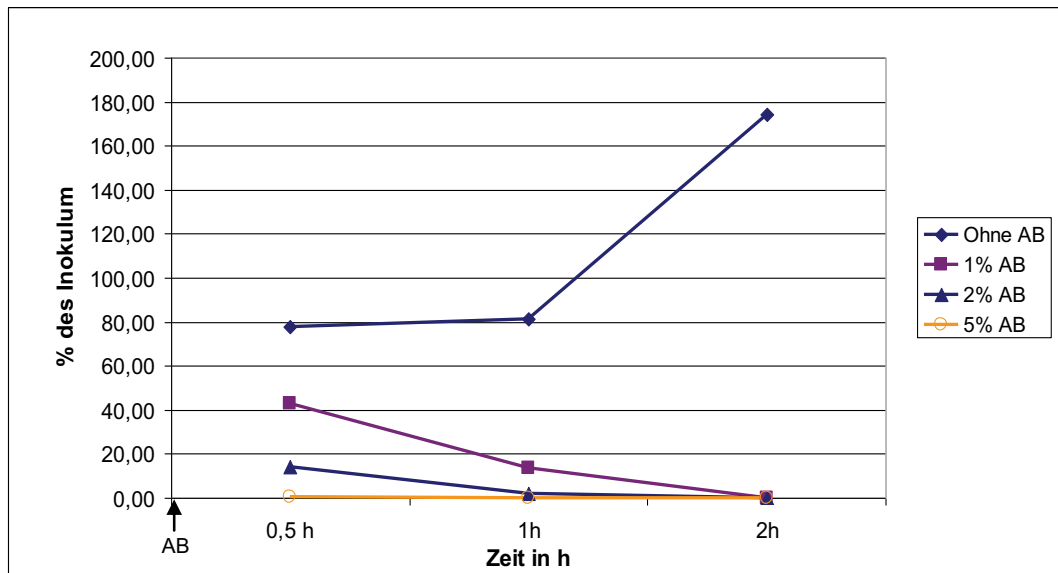


Abbildung 14: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von Penicillin und Streptomycin auf die Zahl der Streptokokken Verschiedene Wells wurden mit der gleichen Menge Bakterien versehen und die Ausgangszahl der Bakterien ermittelt. In die Wells wurden unterschiedliche Mengen Antibiotikum (AB) zugegeben und nach 0,5h, 1h und 2h die noch vorhandene Zahl vermehrungsfähiger Streptokokken bestimmt.

Wie erwartet stieg die Zahl der Bakterien in dem Ansatz ohne Antibiotikum nach 2 Stunden stark an (Abbildung 14). Bei dem Ansatz mit einem Antibiotikagehalt von 1% lebten nach 1h noch 13,41% der anfänglich eingesetzten Bakterien, bei einem Antibiotikagehalt von 2% noch 1,82%. Bei einem Antibiotikagehalt von 5% überlebten nur 0,02% eine Stunde in dem Medium. Dementsprechend wurde für weitere Versuche mit dieser Zelllinie Medium mit einem Antibiotikagehalt von 5% verwendet.

Bestimmung internalisierter *S. pyogenes* mittels CFU-Assay

Im CFU-Assay konnte lediglich die Zahl der intrazellulären Bakterien für die Zeitpunkte 2h, 4h und 8h p.i. untersucht werden. Eine Bestimmung der adhären

Ergebnisse

Bakterien und früherer Zeitpunkte war aufgrund der Eigenschaften der humanen Monozyten mit der angewandten Methode nicht möglich.

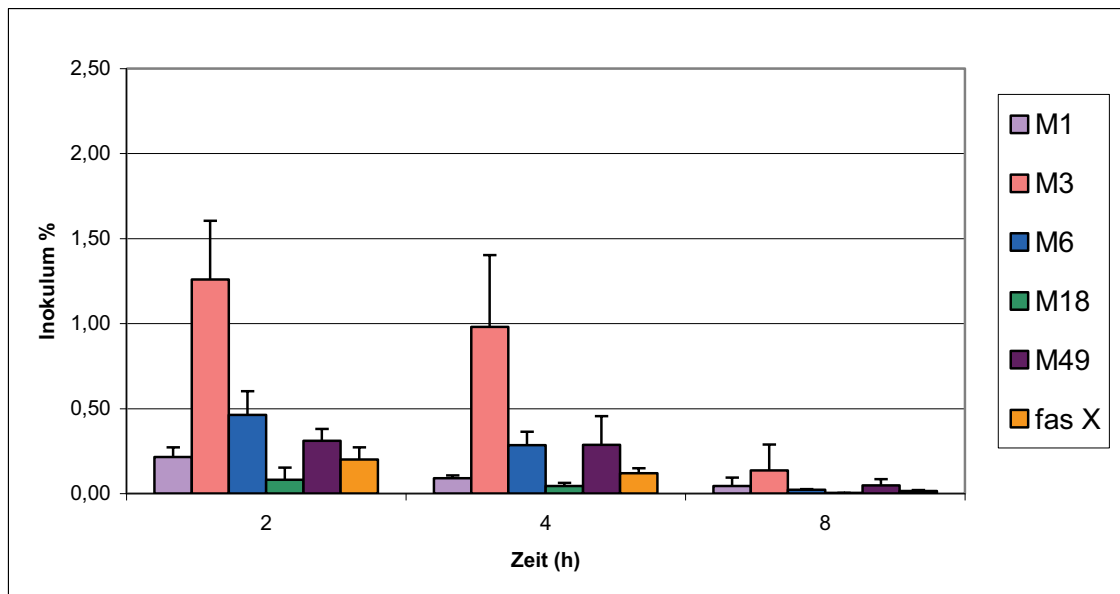


Abbildung 15: Internalisierung verschiedener Gruppe-A-Streptokokken in MM6 im CFU-Assay Es wurde bestimmt, wieviel Prozent der zu Versuchsbeginn zugebenen Bakterien (Inokulum) sich nach dem jeweils angegebenen Zeitraum in den Zellen befanden. Die dargestellten Ergebnisse für jeden Serotyp stellen Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Einzelwerten dar.

Insgesamt fällt die sehr geringe Zahl an intrazellulären Bakterien auf (Abbildung 15). Zusätzlich können, sofern dies bei so geringen Werten überhaupt möglich ist, Serotyp-spezifische Unterschiede erkannt werden. M3 wies zu allen Zeitpunkten die höchste Internalisierungsrate auf. M18 und Δ *fasX* zeigten die geringste Rate an intrazellulären Bakterien.

Wie bei den Mausmakrophagen wurde auch bei den humanen Monozyten zu Versuchsbeginn sowie zu jedem Zeitpunkt die Anzahl der lebenden und toten Zellen bestimmt.

Ergebnisse

	lebende Zellen			tote Zellen	
M1	Mittelwert in %	Stabw. in %		Mittelwert in %	Stabw. in %
0h	93,4	2,2		6,7	2,2
2h	93,3	1,2		6,7	1,2
4h	92,9	1,2		7,1	1,2
8h	93,5	1,5		6,5	1,5
M3	Mittelwert in %	Stabw. in %		Mittelwert in %	Stabw. in %
0h	93,4	2,2		6,7	2,2
2h	92,2	2,3		7,8	2,3
4h	92,9	2,3		7,1	2,3
8h	93,7	0,7		6,3	0,7
M6	Mittelwert in %	Stabw. in %		Mittelwert in %	Stabw. in %
0h	94,1	2,1		5,9	2,1
2h	95,6	2,7		4,4	2,7
4h	94,2	2,8		5,8	2,8
8h	94,1	2,3		5,9	2,3
M18	Mittelwert in %	Stabw. in %		Mittelwert in %	Stabw. in %
0h	94,1	2,1		5,9	2,1
2h	92,9	0,7		7,1	0,7
4h	95,1	1,9		4,9	1,9
8h	92,9	4,5		7,1	4,5
M49	Mittelwert in %	Stabw. in %		Mittelwert in %	Stabw. in %
0h	92,0	1,3		8,0	1,3
2h	91,0	2,8		9,0	2,8
4h	89,1	4,3		10,9	4,3
8h	92,0	2,1		8,0	2,1
Δ fasX	Mittelwert in %	Stabw. in %		Mittelwert in %	Stabw. in %
0h	92,0	1,3		8,0	1,3
2h	93,6	1,9		6,4	1,9
4h	92,4	1,8		7,6	1,8
8h	88,8	3,3		11,2	3,3

Tabelle 2: Entwicklung der Zahl der lebenden und toten eukaryoten MM6 in % In dieser Tabelle ist der prozentuale Anteil der lebenden und toten eukaryoten Zellen an allen Zellen zu jedem Zeitpunkt wiedergegeben.

Die Zellzahlen der lebenden Mono Mac 6 zeigten einen konstanten Verlauf über den Versuchszeitraum (Tabelle 2). Es war weder ein Verlust noch ein Zuwachs an Zellen zu verzeichnen, was auf eine geringe Zytotoxizität der Bakterien gegenüber dieser Zelllinie schließen lässt.

Korrespondierend dazu ließ sich ein etwa konstanter Verlauf des Anteils an toten Zellen nachweisen.

Ergebnisse

Bestimmung internalisierter *S. pyogenes* mittels Doppelimmunfluoreszenz

Es wurde die Zahl der internalisierten Bakterien 2h, 4h und 8h post infectionem (p.i.) bestimmt.

Die Doppelimmunfluoreszenz-Versuche der MM6 sind nicht direkt vergleichbar mit denen der J774, da hier keine direkte Zuordnung von eukaryoten Zellen zu dazugehörigen Bakterien möglich ist. Die Zellen wurden nach dem entsprechenden Infektionszeitraum mittels Zentrifugation auf den Deckgläschen fixiert, dabei wurde die Zellmembran der Monozyten zerstört. In den mikroskopischen Präparaten lagen die zuvor internalisierten Bakterien dann extrazellulär verstreut über das ganze Blickfeld, ohne direkte Zuordnungsmöglichkeit zu den eukaryoten Zellen.

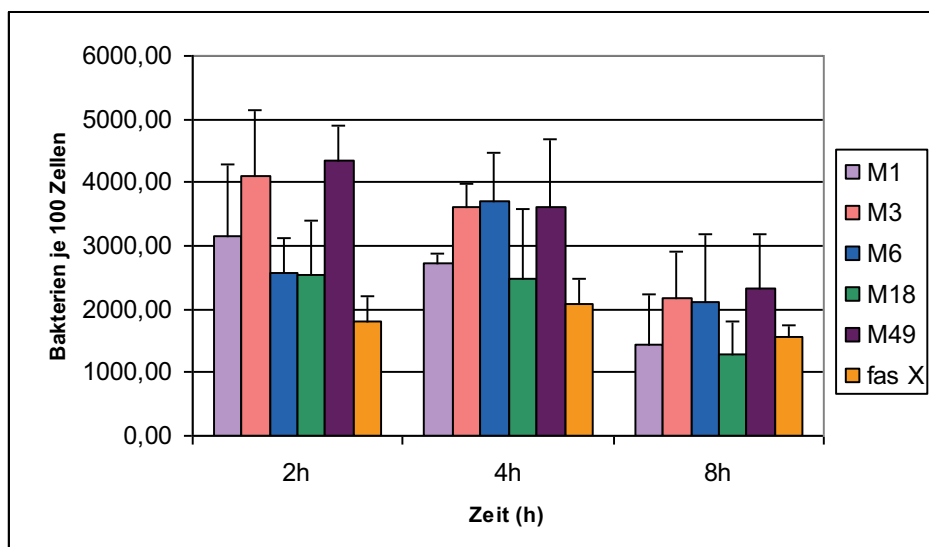


Abbildung 16: Internalisierung der untersuchten Streptokokken-Serotypen in MM6 in der Doppelimmunfluoreszenz Bei dieser Zelllinie wurde nur die Zahl der intrazellulären Bakterienketten bestimmt. Bei jedem Einzelversuch wurden in drei Gesichtsfeldern je die Zahl der internalisierten Bakterienketten sowie die Zahl der Zellkerne der Monozyten ausgezählt (Vergrößerung 1000x). Die Werte wurden hochgerechnet auf 100 eukaryote Zellen, um einen Vergleich der verschiedenen Versuche zu ermöglichen. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus mind. 3 Einzelversuchen.

Zunächst fielen die sehr hohen Bakterienzahlen bei dieser Zelllinie auf (Abbildung 16). Außerdem erkennt man ein leichtes Absinken der Bakterienzahlen über die

Ergebnisse

Zeit, vor allem bei den Serotypen M1, M3 und M49. Die niedrigsten Werte über den ganzen Verlauf zeigte $\Delta fasX$, während der dazugehörige Wildtyp höhere Werte aufwies. Die größten Unterschiede waren 2h p.i. zwischen den verschiedenen Serotypen zu erkennen, insbesondere zwischen M49 und $\Delta fasX$.

3.2.4 Lebend/Tot-Färbung von *S. pyogenes* nach der Infektion von MM6

Analog zu den Versuchen mit den Mausmakrophagen wurde auch in der MM6-Versuchsreihe eine Lebend-Tot-Färbung mit den GAS-Serotypen nach Infektion der Monozyten durchgeführt (Abbildung 17 und 18).

Auch hier erbrachte die Färbung mit dem Live/Dead-Kit im Wesentlichen ein mehr oder weniger konstanten Verlauf. Wesentlich ist das Verhältnis zwischen der Zahl der lebenden und toten Bakterien. Lediglich der Serotyp M18 fiel mit einem geringeren Anteil lebender Streptokokkenketten auf. Wie bereits bei den Mausmakrophagen erwähnt, lassen sich die Unterschiede aufgrund der geringen Bakterienzahl nicht unbedingt verallgemeinern.

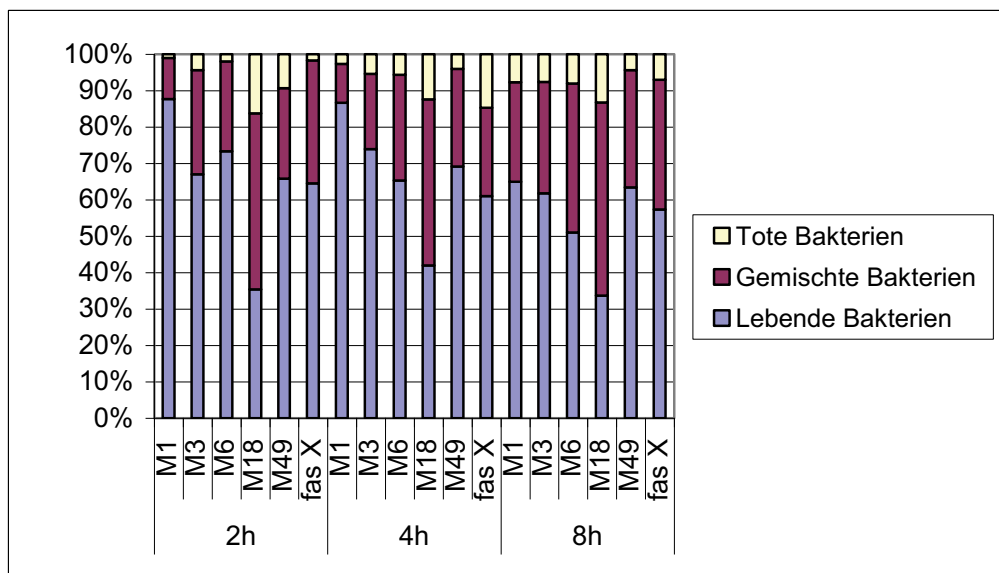


Abbildung 17: Prozentuale Anteile der sich als tot, lebend bzw. gemischt tot und lebenden darstellenden Bakterienketten in MM6-Zellen Es wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop in 3 Gesichtsfeldern die Zahl der lebenden, toten und gemischten Streptokokkenketten bestimmt (Vergrößerung 600x). Die Versuche wurden mindestens 3fach durchgeführt.

Ergebnisse

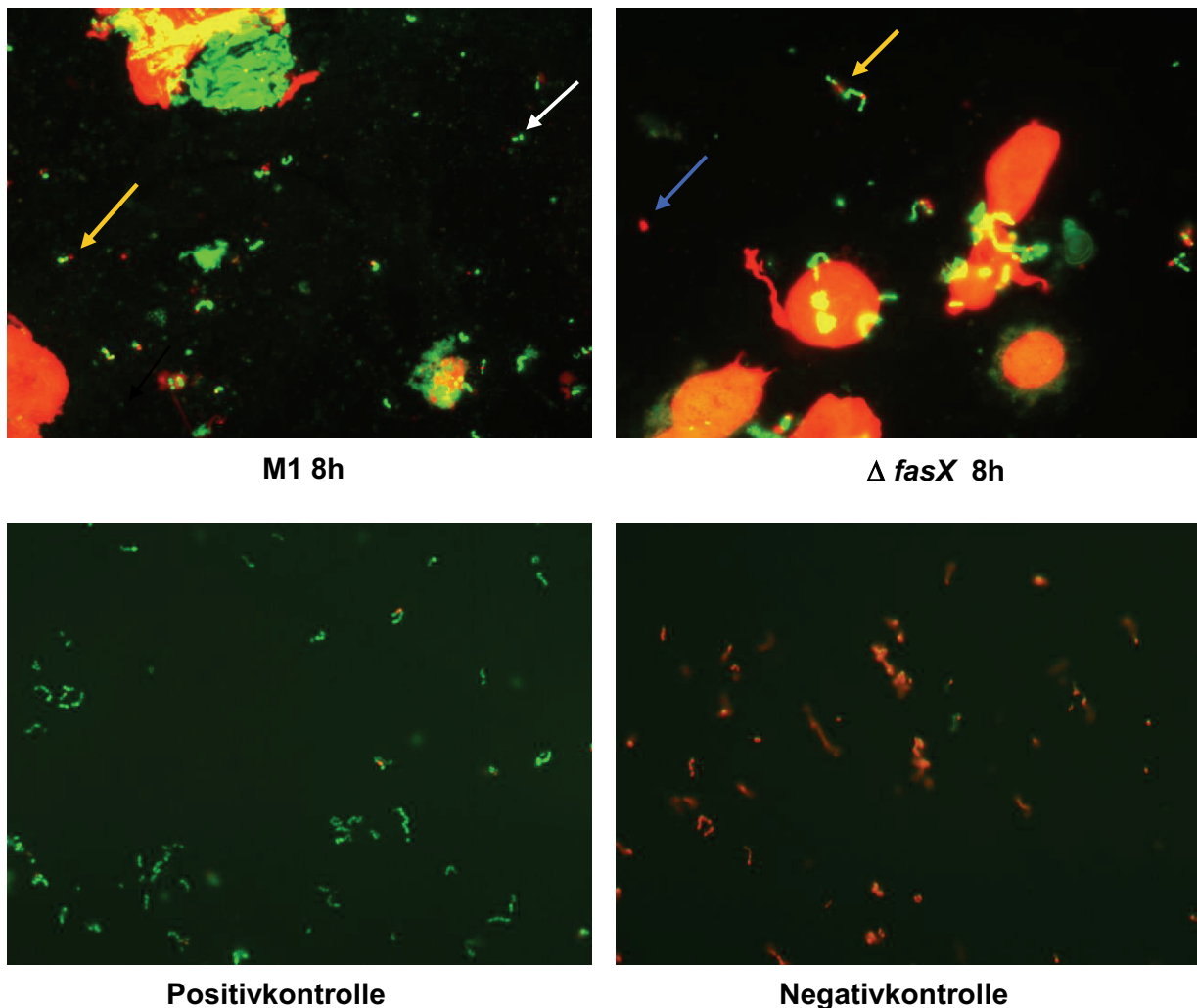


Abbildung 18: Lebend/Tot-Färbung MM6 Die beiden oberen Fotos zeigen exemplarisch die mikroskopischen Präparate der Stämme M1 und $\Delta fasX$ 8h p.i. Die grün fluoreszierenden Ketten sind lebende Bakterien (weißer Pfeil), die roten tote Streptokokken (blauer Pfeil). Es werden ebenfalls gemischte GAS-Ketten nachgewiesen, in denen einzelne Kokken bereits tot sind, andere noch leben (gelbe Pfeile).

3.2.5 Differenzierungsversuche

Es wurde versucht, die humanen Monozyten der Zelllinie MM6 mittels der Chemikalie Phorbol ester in Makrophagen zu überführen (Abbildung 19). Der Versuchsaufbau erstreckte sich über 3 Tage und beinhaltete Phorbol esterkonzentrationen von 50nM bis 0,09 nM. Da Phorbol ester toxisch ist,

Ergebnisse

wurde die Substanz nach 2 Tagen durch Mediumwechsel entfernt. Nicht adhärierte monozytäre Zellen wurden dabei mit dem Medium abgenommen.

Bei Einsatz hoher Phorbolsterkonzentrationen adhärten keine Zellen. Der höchste Anteil an adhären Zellen wurde mit einer Konzentration von 0,75 bzw. 0,375nM nach 2 Tagen erreicht. Nachdem das Medium erneuert und so der Phorbolster und nicht adhären Zellen entfernt wurden, löste sich allerdings ein Großteil der Monozyten wieder vom Untergrund. Daher war eine komplette Versuchsreihe mit den adhären MM6-Zellen und somit ein direkter Vergleich mit den J774-Makrophagen im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit aus Zeitgründen nicht möglich.

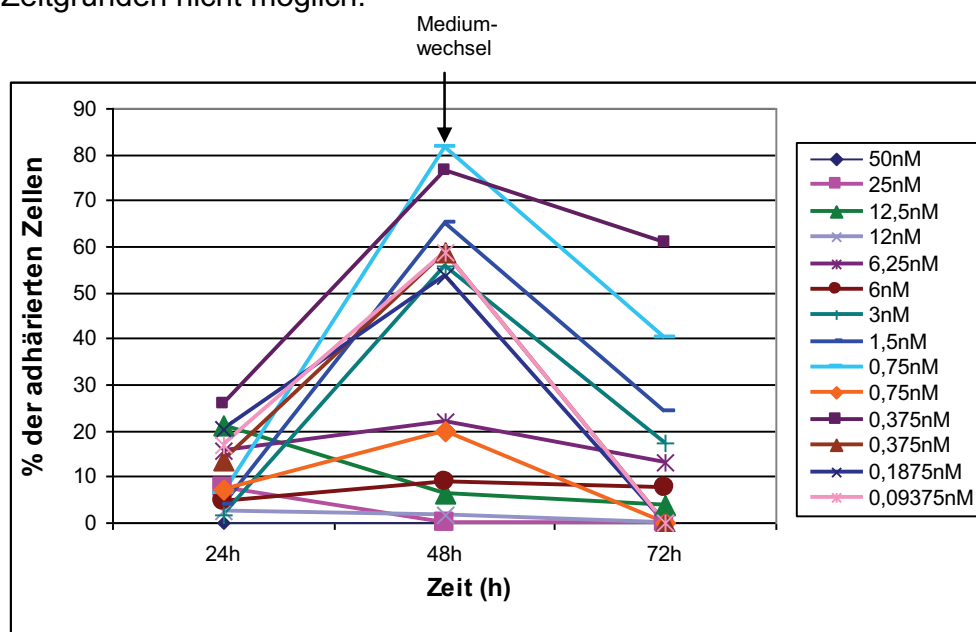


Abbildung 19: Versuch der Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen mittels Phorbolster Es wurden verschiedene Phorbolsterkonzentrationen verwendet, die jeweils 48h auf die Monozyten einwirkten. Nach 24h, 48h und 72h wurde der Anteil der adhären Zellen bestimmt.

4 Diskussion

Gruppe-A-Streptokokken (GAS) gehören zu den wichtigsten humanpathogenen Bakterien und sind in der Lage, eine Vielzahl von Krankheiten auszulösen. Streptokokken sind im Wirt vorwiegend extrazellulär lokalisiert. Sie haben zahlreiche Strategien entwickelt, um zum Beispiel der Phagozytose zu entgehen. Verschiedene Experimente zeigten aber, dass GAS auch intrazellulär überleben können (28, 53). Der intrazelluläre Raum bietet einige Vorteile für Bakterien. Viele Antibiotika sind nicht intrazellulär wirksam. Das körpereigene Immunsystem hat auch nur eingeschränkte Möglichkeiten, in diesem Kompartiment zu wirken. Es verwundert also nicht, dass von vielen anderen Bakterienspezies schon lange bekannt ist, dass sie in Wirtszellen intrazellulär persistieren können. Von der Invasion intrazellulär lebender Bakterien können nicht nur Epithelzellen, sondern auch die Zellen des Immunsystems selbst betroffen sein. Häufig handelt es sich um phagozytierende Zellen wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Makrophagen erfüllen wesentliche Funktionen bei der unspezifischen Immunabwehr und stellen ein wichtiges Bindeglied zur adaptativen Immunabwehr dar (22). Daher können bakterielle Pathogene angeborene und erworbene Immunantworten nicht umgehen, wenn sie keine Strategie für den Umgang mit Makrophagen haben (80).

Einige Bakterienspezies, die in Makrophagen persistieren können, greifen in den Phagosomen-Haushalt ein. Dazu zählen unter anderem Mykobakterien, *Salmonella typhimurium* und *Legionella pneumophila*. Eine weitere Möglichkeit stellt die Interferenz mit Signalkaskaden in den Makrophagen dar, z.B. durch Abschwächung von intrazellulären Signalen oder Modulation von extrazellulären Entzündungsantworten (80). Viele andere pathogene Bakterien nutzen also Zellen des Immunsystems für ihre Zwecke. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von GAS und Monozyten und Makrophagen *in vitro* untersucht, um zu prüfen, ob dieser Mechanismus auch bei den Gruppe-A-Streptokokken eine Rolle spielt.

In den letzten 20 Jahren wurde ein deutlicher Anstieg der systemischen Streptokokkenerkrankungen festgestellt (18). In der vorliegenden Arbeit sollte

Diskussion

geklärt werden, ob die neu erworbene Fähigkeit zur Invasion von eukaryoten Zellen im Allgemeinen und von phagozytierenden Zellen im Speziellen hierfür ursächlich sein könnte. Hierzu wurden die besonders häufig mit schweren Infektionen assoziierten Serotypen mit Streptokokken verglichen, die in erster Linie oberflächliche Haut- und Schleimhautinfektionen hervorrufen. Zusätzlich sollte der Einfluss des FasBCAX-Regulator-Systems auf die Adhärenz an und Invasion von Phagozyten geklärt werden.

Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten die Interaktion von GAS und neutrophilen Granulozyten, ebenfalls phagozytierenden Zellen des unspezifischen Immunsystems. Einige konnten zeigen, dass GAS von den Neutrophilen effektiv phagozytiert und getötet werden (17, 84). Andere wiesen nicht nur eine Persistenz der GAS in den Granulozyten, sondern sogar eine Vermehrung im Zytoplasma nach (62). Es wurde angenommen, dass die zytolytischen Enzyme, Streptolysin S und O der GAS ähnlich dem Listeriolysin der Listerien Poren in die Vakuolenmembran einfügen und so der Inaktivierung in den Phagosomen entgehen (62).

In den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass GAS nicht dauerhaft in den Maus-Makrophagen überleben können. Im CFU-Assay wurde ein deutlicher Abfall der vitalen intrazellulären Bakterien detektiert. In den Doppelimmunfluoreszenzversuchen hingegen wurde ein Anstieg der intrazellulären Bakterien festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass die Bakterien von den Makrophagen aufgenommen werden, aber nicht in ihnen persistieren, sondern sukzessive abgetötet werden (17). Die abgetöteten Bakterienreste werden dann in der Doppelimmunfluoreszenz nachgewiesen. Dieses Resultat deckt sich mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Goldmann (27). Sie wiesen eine effiziente Internalisierung und Beseitigung der GAS durch die Makrophagen nach und betonten die Bedeutung der Makrophagen in der frühen Phase der Infektion.

Zusätzlich können aber Serotyp-spezifische Unterschiede ausgemacht werden. Im CFU-Assay können zwei Gruppen charakterisiert werden: M1, M3 und M18 zeigen eine verstärkte Adhärenz und Internalisierung im Vergleich zu M6, M49 und Δ *fasX*. So werden bei M1 nach 1h fast 40% des Inokulum in Assoziation mit den Makrophagen vorgefunden, das heißt, die Bakterien sind entweder adhäriert oder

Diskussion

internalisiert. Bei M49 sind es nur 5,9%, der Unterschied ist signifikant. Nach 2h sind bei M1 über 9% der Bakterien lebend intrazellulär nachweisbar, bei M49 lediglich 0,44%. Bei vergleichbaren Experimenten mit Gruppe-B-Streptokokken (GBS) fanden Valentin-Weigand et al. 1996 (90) nach 2 Stunden $6 \cdot 10^6$ intrazelluläre Bakterien, entsprechend 60% des Inokulums, die zudem noch über 24h intrazellulär persistierten. Im Vergleich dazu konnten nach 24h praktisch keine GAS in den J774 nachgewiesen werden.

Gleichzeitig zeigten die GAS-Serotypen M1 und M3 in der Doppelimmunfluoreszenz eine starke Kapazität zur Internalisierung. Die Serotypen werden also massiv phagozytiert, sind aber verhältnismäßig widerstandsfähig gegenüber einer Inaktivierung durch Makrophagen. Dies könnte in Verbindung zur erhöhten Virulenz dieser Stämme stehen.

Bei den übrigen Serotypen M6, M49 und $\Delta fasX$ liegt der Anteil der lebenden intrazellulären Bakterien 2h post infectionem deutlich unter 5%, sie sind also weniger widerstandsfähig gegenüber den Tötungsmechanismen der Maus-Makrophagen.

Wird das Verhalten von M49 und $\Delta fasX$ in der Doppelimmunfluoreszenz verglichen, fällt auf, dass die Mutante $\Delta fasX$ trotz gleichen Inokulums schlechter adhärert und internalisiert. Im CFU-Assay finden sich bei beiden in etwa gleich viele lebende Bakterien intrazellulär. Sie werden ähnlich stark von den Phagozyten inaktiviert, sind also tot oder zumindest nicht mehr vermehrungsfähig. Es könnte daraus geschlossen werden, dass die Inaktivierung des *fas*-Operons bewirkt, dass die Bakterien weniger von den Makrophagen phagozytiert werden bzw. adhärieren und internalisieren, aber auch weniger von diesen getötet werden. Ein abgeschaltetes Fas-Regulationssystem könnte also ein klarer Selektionsvorteil in der Auseinandersetzung mit professionellen Phagozyten sein.

Nach der Entdeckung von Fas wurde postuliert, dass dieser Regulator als molekularer Schalter zwischen einem persistierenden oder einen gewebeszstörenden Phänotyp fungiert (43, 46). Die tendenziell verminderte Adhärenz der $\Delta fasX$ -Mutante gegenüber dem Wildtyp steht im Widerspruch zu dieser vorausgehenden Charakterisierung von Fas. Dieser Widerspruch zur Erstcharakterisierung fand sich auch bei anderen Versuchen dieses Labors (43).

Diskussion

In Anbetracht der hier erarbeiteten Ergebnisse kann vermutet werden, dass der Fas-Regulator eine Zunahme der Virulenz des Bakteriums bewirkt, mit verstärkter Adhärenz und Internalisierung sowie Ausschüttung von sezernierten Toxinen wie Streptolysin S. Die Ausschaltung dieses Regulators vermindert die Virulenz und so scheinbar auch die Reaktion der eukaryoten Zelle auf das Bakterium. Diese Theorie wird durch Ergebnisse unterstützt, in denen mit der Δ *fasX*-Mutante infizierte HEp-2-Zellen noch weniger IL-8 ausschütteten als nicht-infizierte HEp-2-Zellen, während mit dem Wildtyp infizierte Zellen einen starken Anstieg der IL-8-Ausschüttung auslösten. Es wurde angenommen, dass Fas in diesem Fall als Negativ-Regulator für eine IL-8-spaltende Protease wirkt (43). Hidalgo-Grass et al. (30, 31) isolierten die Protease ScpC aus infiziertem Gewebe von an nekrotisierender Faszitis Erkrankten und wiesen die Spaltung von Chemokinen *in vitro* nach.

Die intrazelluläre Persistenz scheint in den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen auch abhängig von dem Negativ-Regulator *Nra* zu sein. *Nra* scheint die Bindung von gelöstem Fibronektin zu kontrollieren. Die vermehrte Fibronektinbindung ist assoziiert mit einer Verminderung der Internalisierungsrate. *Nra*-Mutanten zeigten eine höhere Adhärenz und Internalisierung. Sie konnten aus Phagosomen entweichen und verursachten schwere Schäden bei den Wirtszellen, wahrscheinlich durch erhöhte Expression von *SpeB* und Streptolysin S (65).

GAS sind ausschließlich humanpathogene Bakterien. Viele Daten über Streptokokken wurden aber an Mäusen oder Mäusezellen erhoben. Die Interpretation solcher Versuche und Rückschlüsse auf das Verhalten bei menschlichen Zellen sind somit nur begrenzt möglich. Dies haben die hier durchgeführten Versuche mit murinen Makrophagen deutlich belegt, denn diese töten GAS effektiv ab. Dies könnte ein Grund sein, warum GAS nicht tierpathogen sind, sondern ausschließlich den Menschen als Reservoir haben. Gleichzeitig besteht also auch die Möglichkeit, dass GAS wesentlich erfolgreicher im Überlebenskampf mit humanen Makrophagen sind. Darum wurden im Rahmen dieser Dissertation auch Versuche mit humanen Immunzellen, der Monozytenzelllinie Mono Mac 6 (MM6), durchgeführt. Diese zeigte im CFU-Assay insgesamt sehr wenige intrazellulär lokalisierte Bakterien. MM6 nahmen im

Diskussion

Phagozytoseassay keine Latexbeads auf, die Zellen sind also nicht phagozytär aktiv. Die wenigen intrazellulären Bakterien im CFU-Assay müssen also aktiv in die Zellen eingedrungen sein.

Bei allen Isolaten zeigte sich ein Abfall der Zahl der lebenden intrazellulären Bakterien über die Zeit. Dies bedeutet, dass die GAS nicht in der Lage sind, in den Monozyten zu persistieren. Nur M3 erreichte Überlebensraten über 1% und wies damit signifikante Unterschiede zu den anderen M-Serotypen auf. Innerhalb der anderen Isolate konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. GAS können offensichtlich noch schlechter in humanen Monozyten überleben als in Maus-Makrophagen.

In der Doppelimmunfluoreszenz wurde eine große Zahl von Bakterien angefärbt, deren Zahl über die Zeit abnahm. Die angefärbten Bakterien befanden sich nicht intrazellulär sondern extrazellulär verstreut. Dies kann an der Methodik liegen (Zentrifugation zur Fixierung auf dem Untergrund und damit Zerstörung der Zellmembranen der MM6). Eine wahrscheinlichere Möglichkeit ist, dass die Bakterien nicht in die Monozyten eingedrungen sind. Die extrazellulären Bakterien wurden zwar durch die Zugabe von Antibiotika abgetötet, die toten Bakterien aber nicht durch Waschen aus der Lösung entfernt. Dies würde die hohe Zahl an nachgewiesenen Bakterien bei fehlender phagozytotischer Aktivität erklären.

In der Lebend-Tot-Färbung wird zwar ein hoher Anteil der Bakterien als lebend ausgewiesen, es könnte hier aber ein methodischer Fehler vorliegen. Es ist denkbar, dass bei Bearbeitung der Zellen nicht nur die Struktur der eukaryoten Zellen, sondern auch die der toten Bakterienketten zerstört wurde. Dies würde zu einer scheinbaren Senkung des Anteils der toten Bakterien führen. Das würde auch zu der Beobachtung passen, dass sich in den Präparaten der Lebend-Tot-Färbung insgesamt nur wenige Streptokokken fanden.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass GAS in neutrophilen Granulozyten von Mäusen überleben können (61, 62, 84, 94), während andere eine effiziente Tötung der GAS durch Maus-Phagozyten fanden (17, 27). Sicher ist, dass GAS nicht-phagozytierende Zellen invadieren und dort persistieren können, und das in einem Umfang, der dem fakultativ intrazellulärer Bakterien entspricht (53, 62, 63).

Diskussion

Da die Zahl der vitalen Bakterien in den Epithelzellen in vielen Experimenten mit der Zeit abfiel (28, 43), wurde von einigen Arbeitsgruppen daraus geschlossen, dass GAS nicht intrazellulär proliferieren können und somit das Eindringen von GAS in die Epithelzellen nicht den ersten Schritt für eine systemische Infektion darstelle (81). Vielmehr würden die Gruppe-A-Streptokokken den intrazellulären Raum lediglich zum Schutz vor der Wirtsabwehr und Antibiotika nutzen, um so im Wirt zu persistieren.

Es ist aber möglich, dass die invasiven Serotypen wie M1 und M3 sich hier von den anderen M-Typen unterscheiden. In den hier durchgeführten Experimenten wurden teilweise signifikant mehr vitale Bakterien dieser Serotypen intrazellulär nachgewiesen. Es ist denkbar, dass die besonders invasiven Stämme unter günstigen Umgebungsbedingungen durchaus längere Zeit in Immunzellen persistieren und sich so besonders leicht ausbreiten können. Von Gruppe-B-Streptokokken (GBS) ist schon seit längerem bekannt, dass sie die Invasion von und Persistenz in Phagozyten zur systemischen Dissemination nutzen. Ausgehend von der lokalen Entzündung disseminieren sie mit Hilfe von phagozytierenden Zellen und lösen schwere Pneumonien und Meningitiden bei Neugeborenen aus (63, 90).

Bestätigt wird diese Theorie von den Ergebnissen der Forschungsgruppe um Thulin (85). Sie untersuchten die Biopsien von antibiotisch therapierten Patienten mit schweren Weichteilinfektionen und fanden große Mengen an vitalen GAS sowohl extrazellulär als auch innerhalb von Makrophagen. Der größte Anteil an intrazellulären GAS wurde interessanterweise in Biopsien von relativ frisch betroffenem Gewebe gefunden. In nachfolgenden *in vitro*-Versuchen mit den invasiven GAS-Stämmen und humanen Monozyten sowie Makrophagen wurden in 30% bis 60% der eukaryoten Zellen bis zu 20h lebende Bakterien nachgewiesen. Wurden die extrazellulären Antibiotika 12h p.i. entfernt, fanden sich nach einer zeitlichen Verzögerung von 2h wieder zahlreiche Bakterien im Kulturmedium. Das stützt die Vermutung, dass Streptokokken in der Lage sind, das Verlassen der Wirtszelle in einem günstigen Moment selbst zu induzieren. Diese Meinung wurde auch von Marouni et al. (58) vertreten.

Diskussion

Die Lokalisation der GAS ist scheinbar abhängig von der Schwere der Gewebsinfektion. In relativ frisch infiziertem Gewebe befanden sich die Bakterien vor allem innerhalb der Makrophagen, während sie bei stärker betroffenem Gewebe nur extrazellulär oder intra- und extrazellulär gefunden wurden. Sobald die Infektion etabliert und ein Schutz vor der Immunabwehr nicht mehr erforderlich ist, verlassen die Streptokokken die intrazelluläre Nische wieder.

Die Rolle der Wirtseigenschaften ist für den Ausgang der Infektion nicht zu unterschätzen. Neben bereits bekannten, allgemeinen Risikofaktoren wie Alter, chronischen Grunderkrankungen und Immunsuppression spielen auch genetische Komponenten des Wirts eine wichtige Rolle, wenn es um die Frage der Anfälligkeit für GAS-Infektionen geht (26). Individuen, die mit dem gleichen Serotyp infiziert sind, können sehr verschiedene Manifestationen entwickeln. Verschiedene Mäusestämme unterschieden sich merklich in ihrer Anfälligkeit für GAS-Infektionen (25, 26). In einer Studie in Minnesota wurde ein einziger Streptokokken-Klon bei Patienten mit Pharyngitis, asymptomatischen Trägern und systemisch Erkrankten nachgewiesen (8). Bestimmte HLA-Klasse-II-Typen verleihen einen starken Schutz vor schwerer systemischer Erkrankung, während andere das Risiko für eine schwere Erkrankung erhöhten. Grund hierfür könnte die Fähigkeit sein, die Zytokin-Antworten, die durch streptokokkale Superantigene ausgelöst werden, zu regulieren (44).

Das zeigt, dass unabhängig vom Bakterium zusätzlich spezifische Eigenschaften des Wirts entscheidend für den Verlauf einer Infektion sind.

Abhängig von Virulenz und Eigenschaften des invadierenden Bakteriums sowie Art der betroffenen Zellen kann die Invasion unterschiedliche Rollen in der Pathogenese der GAS einnehmen:

1. GAS-Serotypen, die mit oberflächlichen Infektionen assoziiert sind, nutzen die Invasion von Epithelzellen zur Persistenz im Wirt und können rekurrente Infektionen auslösen (53, 73, 74, 75). Diese Tatsache wurde bereits für das Therapie-Versagen mit Penicillin bei GAS-Pharyngitiden verantwortlich gemacht. Streptokokken-Isolate von Patienten nach gescheiterter Antibiotikatherapie adhärirten und internalisierten wesentlich effizienter an Epithelzellen als

Diskussion

erfolgreich eradizierte Stämme (57). Die Rate der asymptomatischen Träger von GAS liegt geschlechts- und saisonunabhängig bei ca. 2% (32).

2. Mit schwer verlaufenden, systemischen Infektionen assoziierte Gruppe-A-Streptokokken können mithilfe der Invasion von Makrophagen tiefergehende schwere Weichteilinfektionen verursachen (85). Die Internalisierung der Makrophagen könnte die Ausbreitung der Bakterien innerhalb des Gewebes begünstigen (85). Möglich ist auch eine systemische Ausbreitung durch eine Persistenz in neutrophilen Granulozyten (61, 62, 84, 94).

3. Die Internalisierung in Epithelzellen und Immunzellen kann ebenfalls Zeichen des Unvermögens der GAS sein, einer Phagozytose und Eliminierung durch das angeborene Immunsystem zu entgehen. Dies scheint bei den hier erhobenen Daten der Fall zu sein (27, 68, 81).

Ein weiteres Verständnis der zugrunde liegenden Pathomechanismen von Persistenz und systemischer Ausbreitung der Streptokokken im Menschen ist äußerst wichtig. Asymptomatische Träger sind das Hauptreservoir für Streptokokken. Wenn es möglich wäre, gezielt in die Invasion von eukaryoten Zellen einzugreifen, könnten die Streptokokkenbestände maßgeblich dezimiert oder sogar eliminiert werden. Auch wenn das nicht gelingt, wären ganz neue Therapieansätze der systemischen Streptokokken-Erkrankungen möglich.

5 Zusammenfassung

S. pyogenes ist ein bedeutender bakterieller Krankheitserreger des Menschen. Die Pathomechanismen dieser Bakterien sind seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschungen. Bis vor wenigen Jahren galten Gruppe-A-Streptokokken (GAS) als ausschließlich extrazelluläre Bakterien. Es konnte aber gezeigt werden, dass GAS nicht nur in der Lage sind, in Epithelzellen einzudringen, sondern auch über längere Zeit in ihnen zu überleben (28, 53).

Seit den 80er Jahren nahm die Inzidenz der systemischen Streptokokkenkrankungen auffallend zu (18). Da von anderen Bakterien bereits bekannt ist, dass sie die Invasion von phagozytierenden Zellen nutzen, um im Wirt zu disseminieren, stellte sich die Frage, ob die häufig mit systemischer Erkrankung assoziierten GAS-Serotypen ebenfalls diese Strategie verfolgen und so die Inzidenzzunahme der systemischen Erkrankungen zu erklären sei.

Es sollte eine mögliche Rolle der Invasion von Phagozyten im natürlichen Infektionsprozess der GAS geklärt werden. Weiterhin wurde der Einfluß des FasBCAX-Systems, eines Regulatorsystems für Virulenzfaktoren, auf die Invasion von Immunzellen untersucht.

Das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten der Bakterien an die Zelllinien wurde mit 2 unterschiedlichen Methoden untersucht. Hierfür wurden sechs Serotypen von *S. pyogenes* und zwei Immunzelllinien ausgewählt. Da GAS ausschließlich humanpathogene Bakterien sind, wurde neben der Maus-Makrophagen-Zelllinie J774 die humane Monozyten-Zelllinie Mono Mac 6 (MM6) untersucht. Unter den ausgewählten Bakterienisolaten befand sich neben 5 Wildtypen eine Mutante, in der das FasBCAX-System durch Deletionsmutagenese ausgeschaltet wurde.

In den hier durchgeführten Versuchen konnten GAS nicht längere Zeit in den Phagozyten überleben, sondern wurden sukzessive abgetötet. Damit werden Ergebnisse anderer Forschungsgruppen bestätigt (27, 81). Es ließen sich aber Serotyp-spezifische Unterschiede feststellen. Die mit schweren Krankheitsverläufen assoziierten Serotypen M1 und M3 wurden mittels

Zusammenfassung

Doppelimmunfluoreszenz vermehrt intrazellulär nachgewiesen und zeigten im CFU-Assay eine erhöhte intrazelluläre Vitalität gegenüber den anderen Serotypen. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass diese Serotypen häufig systemische GAS-Erkrankungen auslösen (39).

Die Aufnahme der Bakterien in die Immunzellen ist in den hier durchgeführten Experimenten ein Ausdruck der Unfähigkeit der Bakterien, die Phagozytose und konsekutive Beseitigung zu verhindern. Diese Theorie wurde auch von Schrag et al. (81) vertreten. Je nach Eigenschaften des untersuchten GAS-Isolates und des infizierten Organismus kann die Invasion auch zu asymptomatischer Trägerschaft und Persistenz im Wirt oder invasiver Ausbreitung im Gewebe sowie systemischer Erkrankung führen. Dies konnte in zahlreichen Arbeiten anderer Forschergruppen bestätigt werden (53, 73, 74, 75, 85).

Die Δ *fasX*-Mutante wurde in geringerer Zahl intrazellulär sowie an die eukaryoten Zellen adhäriert vorgefunden als der Wildtyp M49. Daraus kann geschlossen werden, dass das Fas-Operon an der Hochregulierung von Adhäsinen beteiligt ist. Damit werden Ergebnisse anderer Forscher bestätigt (43). Zugleich wird die Δ *fasX*-Mutante scheinbar weniger von den Phagozyten abgetötet. Der Fas-Regulator scheint nicht an der Persistenz nach Aufnahme in Makrophagen beteiligt zu sein, sondern bewirkt bei seiner Aktivierung eine erhöhte Aggressivität der GAS. Dementsprechend stellt das herunterregulierte Fas-System einen Selektionsvorteil für Gruppe-A-Streptokokken dar.

6 Literaturverzeichnis

1. **Berkower C, Ravins M, Moses AE, Hanski E.** 1999. Expression of different group A streptococcal M proteins in an isogenic background demonstrates diversity in adherence to and invasion of eukaryotic cells. *Mol Microbiol.* **31**:1463-75.
2. **Bhakdi S, Weller U, Walev I, Martin E, Jonas D, Palmer M.** 1993. A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. **182**:167-75.
3. **Bisno AL, Brito MO, Collins CM.** 2003. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect. Dis.* **3**:191-200
4. **Bisno AL.** 1990. The resurgence of acute rheumatic fever in the United States. *Annu. Rev. Med.* **41**:319-329.
5. **Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M.** 2005. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis.* **5**:685-94.
6. **Carr A, Sledjeski DD, Podbielski A, Boyle MD, Kreikemeyer B.** 2001. Similarities between complement-mediated and streptolysin S-mediated hemolysis. *J Biol Chem.* **276**:41790-6.
7. **Cleary PP, Kaplan EL, Handley JP, Wlazlo A, Kim MH, Hauser AR, Schlievert PM.** 1992. Clonal basis for resurgence of serious *Streptococcus pyogenes* disease in the 1980s. *Lancet.* **339**:518-21.
8. **Cockerill FR 3rd, MacDonald KL, Thompson RL, Roberson F, Kohner PC, Besser-Wiek J, Manahan JM, Musser JM, Schlievert PM, Talbot J, Frankfort B, Steckelberg JM, Wilson WR, Osterholm MT.** 1997. An outbreak of invasive group A streptococcal disease associated with high carriage rates of the invasive clone among school-aged children *JAMA.* **277**:38-43.

Literaturverzeichnis

9. **Courtney HS, Dale JB, Hasty DI.** 1996. Differential effects of the streptococcal fibronectin-binding protein, FBP54, on adhesion of group A streptococci to human buccal cells and HEP-2 tissue culture cells. *Infect Immun.* **64**:2415-9.
10. **Courtney HS, Hasty DL, Dale JB.** 2002. Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann Med.* **34**:77-87.
11. **Courtney, HS, Podbielski A.** 2004. Group A streptococcal invasion of host cells, p. 239-273. In: R. J. Lamont (Hrsg.), *Bacterial invasion of host cells*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
12. **Cunningham MW.** 2000 Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* **13**:470-511.
13. **Cywes C, Stamenkovic I, Wessels MR.** 2000. CD44 as a receptor for colonization of the pharynx by group A streptococcus. *J. Clin. Invest.* **106**:995-1002.
14. **Cywes C, Wessels MR.** 2001. Group A Streptococcus tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature.* **414**:648-52.
15. **Davies HD, McGeer A, Schwartz B, Green K, Cann D, Simor AE, Low DE.** 1996. Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. Ontario Group A Streptococcal Study Group., *N Engl J Med.* **335**:547-54.
16. **DeLeo FR.** 2004. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis.* **9**:399-413.
17. **DeMaster E, Schnitzler N, Cheng Q, Cleary P.** 2002. M(+) group a streptococci are phagocytized and killed in whole blood by C5a-activated polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* **70**:350-9.
18. **Efstratiou A.** 2000. Group A streptococci in the 1990s. *J Antimicrob Chemother.* **45** Suppl:3-12.

Literaturverzeichnis

19. **Ekelund K, Skinhøj P, Madsen J, Konradsen HB.** 2005. Reemergence of emm1 and a changed superantigen profile for group A streptococci causing invasive infections: results from a nationwide study. *J Clin Microbiol.* **43**:1789-96.
20. **Facklam RF, Martin DR, Lovgren M, Johnson DR, Efstratiou A, Thompson TA, Gowan S, Kriz P, Tyrrell GJ, Kaplan E, Beall B** 2002. Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: emm103 to emm124. *Clin Infect Dis.* **34**:28-38.
21. **Fischetti VA.** 1989. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin Microbiol Rev.* **2**:285-314.
22. **Geppert TD, Lipsky PE.** 1989. Antigen presentation at the inflammatory site. *Crit Rev Immunol.* **9**:313-62.
23. **Gerlach D, Knoll H, Kohler W, Ozegowski JH, Hribalova V.** 1983. Isolation and characterization of erythrogenic toxins. V. Communication: identity of erythrogenic toxin type B and streptococcal proteinase precursor. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A].* **255**:221-33.
24. **Giannakis E, Jokiranta TS, Ormsby RJ, Duthy TG, Male DA, Christiansen D, Fischetti VA, Bagley C, Loveland BE, Gordon DL.** 2002. Identification of the streptococcal M protein binding site on membrane cofactor protein (CD46). *Immunol.* **168**:4585-92.
25. **Goldmann O, Chhatwal GS, Medina E** 2003. Immune mechanisms underlying host susceptibility to infection with group A streptococci. *J Infect Dis.* **187**:854-61.
26. **Goldmann O, Chhatwal GS, Medina E.** 2004. Role of host genetic factors in susceptibility to group A streptococcal infections. *Indian J Med Res.* **119** Suppl:141-3.
27. **Goldmann O, Rohde M, Chhatwal GS, Medina E.** 2004. Role of macrophages in host resistance to group A streptococci. *Infect Immun.* **72**:2956-63.

Literaturverzeichnis

28. **Greco R, De Martino L, Donnarumma G, Conte MP, Seganti L, Valenti P.** 1995. Invasion of cultured human cells by *Streptococcus pyogenes*. Res Microbiol. **146**:551-60.
29. **Hauser AR, Stevens DL, Kaplan EL, Schlievert PM.** 1991. Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from *Streptococcus pyogenes* isolates associated with toxic shock-like syndrome. J Clin Microbiol. **29**:1562-7.
30. **Hidalgo-Grass C, Dan-Goor M, Maly A, Eran Y, Kwinn LA, Nizet V, Ravins M, Jaffe J, Peyser A, Moses AE, Hanski E.** 2004. Effect of a bacterial pheromone peptide on host chemokine degradation in group A streptococcal necrotising soft-tissue infections. Lancet. **363**:696-703.
31. **Hidalgo-Grass C, Mishalian I, Dan-Goor M, Belotserkovsky I, Eran Y, Nizet V, Peled A, Hanski E.** 2006. A streptococcal protease that degrades CXC chemokines and impairs bacterial clearance from infected tissues. EMBO J. **25**:4628-37.
32. **Hoffmann S.** 1985. The throat carrier rate of group A and other beta hemolytic streptococci among patients in general practice. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]. **93**:347-51.
33. **Hoge CW, Schwartz B, Talkington DF, Breiman RF, MacNeill EM, Englander SJ.** 1993. The changing epidemiology of invasive group A streptococcal infections and the emergence of streptococcal toxic shock-like syndrome. A retrospective population-based study. JAMA. **269**:384-9.
34. **Horstmann RD, Sievertsen HJ, Knobloch J, Fischetti VA.** 1988. Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. Proc Natl Acad Sci U S A. **85**:1657-61.
35. **Hume DA.** 2006. The mononuclear phagocyte system. Curr Opin Immunol. **18**:49-53.

Literaturverzeichnis

36. **Jasir A, Noorani A, Mirsalehian A, Schalen C.** 2000. Isolation rates of *Streptococcus pyogenes* in patients with acute pharyngotonsillitis and among healthy school children in Iran. *Epidemiol Infect.* **124**:47-51.
37. **Johnson AJ, Tillett WS.** 1952. The lysis in rabbits of intravascular blood clots by the streptococcal fibrinolytic system (streptokinase). *J Exp Med.* **95**:449-64.
38. **Johnson DR, Kaplan EL, VanGheem A, Facklam RR, Beall B.** 2006. Characterization of group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*): correlation of M-protein and emm-gene type with T-protein agglutination pattern and serum opacity factor. *J Med Microbiol.* **55**:157-64.
39. **Johnson DR, Stevens DL, Kaplan EL** 1992. Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngitis. *J Infect Dis.* **166**:374-82.
40. **Kapur V, Majesky MW, Li LL, Black RA, Musser JM.** 1993. Cleavage of interleukin 1 beta (IL-1 beta) precursor to produce active IL-1 beta by a conserved extracellular cysteine protease from *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:7676-80.
41. **Kapur V, Topouzis S, Majesky MW, Li LL, Hamrick MR, Hamill RJ, Patti JM, Musser JM.** 1993. A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microb Pathog.* **15**:327-46.
42. **Kaul R, McGeer A, Low DE, Green K, Schwartz B.** 1997. Population-based surveillance for group A streptococcal necrotizing fasciitis: Clinical features, prognostic indicators, and microbiologic analysis of seventy-seven cases. Ontario Group A Streptococcal Study. *Am J Med.* **103**:18-24.
43. **Klenk M, Koczan D, Guthke R, Nakata M, Thiesen HJ, Podbielski A, Kreikemeyer B.** 2005. Global epithelial cell transcriptional responses reveal *Streptococcus pyogenes* Fas regulator activity association with bacterial aggressiveness. *Cell Microbiol.* **7**:1237-50.

Literaturverzeichnis

44. **Kotb M, Norrby-Teglund A, McGeer A, El-Sherbini H, Dorak MT, Khurshid A, Green K, Peeples J, Wade J, Thomson G, Schwartz B, Low DE.** 2002. An immunogenetic and molecular basis for differences in outcomes of invasive group A streptococcal infections. *Nat Med* **8**:1398-404.
45. **Kotb M.** 1995. Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens. *Clin Microbiol Rev.* **8**:411-26.
46. **Kreikemeyer B, Boyle MD, Buttarro BA, Heinemann M, Podbielski A.** 2001. Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (Fas) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. *Mol Microbiol.***39**:392-406.
47. **Kreikemeyer B, Klenk M, Podbielski A.** 2004. The intracellular status of *Streptococcus pyogenes*: role of extracellular matrix-binding proteins and their regulation. *Int J Med Microbiol.* **294**:177-88.
48. **Kreikemeyer B, McIver KS, Podbielski A.** 2003. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol.* **11**:224-32.
49. **Kreikemeyer B, Nakata M, Oehmcke S, Gschwendtner C, Normann J, Podbielski A.** 2005. *Streptococcus pyogenes* collagen type I-binding Cpa surface protein. Expression profile, binding characteristics, biological functions, and potential clinical impact. *J Biol Chem.* **280**:33228-39.
50. **Kreikemeyer B, Oehmcke S, Nakata M, Hoffrogge R, Podbielski A.** 2004. *Streptococcus pyogenes* fibronectin-binding protein F2: expression profile, binding characteristics, and impact on eukaryotic cell interactions. *J Biol Chem.* **279**:15850-9.
51. **Lancefield RC.** 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**:571-595.

Literaturverzeichnis

52. **Lancefield RC.** 1962. Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. J Immunol. **89**:307-13.
53. **LaPenta D, Rubens C, Chi E, Cleary PP.** 1994. Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. **91**:12115-9.
54. **Lee PK, Deringer JR, Kreiswirth BN, Novick RP, Schlievert PM.** 1991. Fluid replacement protection of rabbits challenged subcutaneous with toxic shock syndrome toxins. Infect Immun. **59**:879-84.
55. **Lee PK, Schlievert PM.** 1989. Quantification and toxicity of group A streptococcal pyrogenic exotoxins in an animal model of toxic shock syndrome-like illness. J Clin Microbiol. **27**:1890-2.
56. **Lei B, DeLeo FR, Hoe NP, Graham MR, Mackie SM, Cole RL, Liu M, Hill HR, Low DE, Federle MJ, Scott JR, Musser JM.** 2001. Evasion of human innate and acquired immunity by a bacterial homolog of CD11b that inhibits opsonophagocytosis. Nat Med. **7**:1298-305
57. **Marouni MJ, Barzilai A, Keller N, Rubinstein E, Sela S.** 2004. Intracellular survival of persistent group A streptococci in cultured epithelial cells. Int J Med Microbiol. **294**:27-33.
58. **Marouni MJ, Sela S.** 2004. Fate of *Streptococcus pyogenes* and epithelial cells following internalization. J Med Microbiol. **53**:1-7.
59. **Matalova E, Spanova A, Kovaru F.** 2003. Apoptotic DNA alterations in pig leukocytes after phagocytosis of bacteria are linked to maturation of the immune system. Physiol Res. **52**:235-42.
60. **Medina E, Goldmann O, Rohde M, Lengeling A, Chhatwal GS** 2001. Genetic control of susceptibility to group A streptococcal infection in mice. J Infect Dis. **184**:846-52.

Literaturverzeichnis

61. **Medina E, Goldmann O, Toppel AW, Chhatwal GS.** 2003. Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion. *J Infect Dis.* **187**:597-603.
62. **Medina E, Rohde M, Chhatwal GS.** 2003 Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence. *Infect Immun.* **71**:5376-80.
63. **Molinari G, Chhatwal GS.** 1999. Streptococcal invasion. *Curr Opin Microbiol.* **2**:56-61.
64. **Molinari G, Rohde M, Guzman CA, Chhatwal GS.** 2000. Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells. *Cell Microbiol.* **2**:145-54.
65. **Molinari G, Rohde M, Talay SR, Chhatwal GS, Beckert S, Podbielski A.** 2001. The role played by the group A streptococcal negative regulator Nra on bacterial interactions with epithelial cells. *Mol Microbiol.* **40**:99-114.
66. **Molinari G, Talay SR, Valentin-Weigand P, Rohde M, Chhatwal GS.** 1997. The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun.* **65**:1357-63.
67. **Musser JM, Hauser AR, Kim MH, Schlievert PM, Nelson K, Selander RK.** 1991. *Streptococcus pyogenes* causing toxic-shock-like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:2668-72
68. **Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T.** 2004. Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science.* **306**:1037-40.
69. **Nizet V.** 2002. Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends Microbiol.* **10**:575-80.

Literaturverzeichnis

70. **Norrby-Teglund A, Chatellier S, Low DE, McGeer A, Green K, Kotb M.** 2000. Host variation in cytokine responses to superantigens determine the severity of invasive group A streptococcal infection. *Eur J Immunol.* **30**:3247-55.
71. **Norrby-Teglund A, Thulin P, Gan BS, Kotb M, McGeer A, Andersson J, Low DE.** 2001. Evidence for superantigen involvement in severe group a streptococcal tissue infections. *J Infect Dis.* **184**:853-60.
72. **Oehmcke S, Podbielski A, Kreikemeyer B.** 2004. Function of the fibronectin-binding serum opacity factor of *Streptococcus pyogenes* in adherence to epithelial cells. *Infect Immun.* **72**:4302-8.
73. **Österlund A, Engstrand L.** 1997. An intracellular sanctuary for *Streptococcus pyogenes* in human tonsillar epithelium - studies of asymptomatic carriers and *in vitro* cultured biopsies. *Acta Otolaryngol.* **117**:883-888.
74. **Österlund A, Popa R, Nikkilä T, Scheynius A, Engstrand L.** 1997. Intracellular reservoir of *Streptococcus pyogenes in vivo*: a possible explanation for recurrent pharyngotonsillitis. *Laryngoscope* **107**:640-647.
75. **Podbielski A, Beckert S, Schattke R, Leithauser F, Lestin F, Gossler B, Kreikemeyer B.** 2003. Epidemiology and virulence gene expression of intracellular group A streptococci in tonsils of recurrently infected adults. *Int. J. Med. Micro-biol.* **293**:179-190.
76. **Podbielski A, Kreikemeyer B.** 2001. Persistence of group A streptococci in eukaryotic cells--a safe place? *Lancet.* **358**:3-4
77. **Ralph P, Moore MA, Nilsson K.** 1976. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med.* **143**:1528-33.
78. **Ranin L, Opavski N, Djukic S, Mijac V.** 2004. Epidemiology of diseases caused by *Streptococcus pyogenes* in Serbia during a nine-year period (1991-1999). *Indian J Med Res.* **119** Suppl:155-9.

Literaturverzeichnis

79. **Reichardt W, Müller-Alouf H, Alouf JE, Köhler W.** 1992. Erythrogenic toxins A, B and C: occurrence of the genes and exotoxin formation from clinical *Streptococcus pyogenes* strains associated with streptococcal toxic shock-like syndrome. *FEMS Microbiol Lett.* **79**:313-22.
80. **Rosenberger CM, Finlay BB.** 2003. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**:385-96.
81. **Schrager HM, Rheinwald JG, Wessels MR.** 1996. Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection. *J Clin Invest.* **98**:1954-8.
82. **Shannon O, Hertzén E, Norrby-Teglund A, Mörgelin M, Sjöbring U, Björck L.** 2007. Severe streptococcal infection is associated with M protein-induced platelet activation and thrombus formation. *Mol Microbiol.* **65**:1147-57.
83. **Smoot JC, Barbian KD, Van Gompel JJ, Smoot LM, Chaussee MS, Sylva GL, Sturdevant DE, Ricklefs SM, Porcella SF, Parkins LD, Beres SB, Campbell DS, Smith TM, Zhang Q, Kapur V, Daly JA, Veasy LG, Musser JM.** 2002. Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:4668-73.
84. **Staal L, Mörgelin M, Björck L, Tapper H.** 2003. *Streptococcus pyogenes* expressing M and M-like surface proteins are phagocytosed but survive inside human neutrophils. *Cell Microbiol.* **5**:253-65.
85. **Thulin P, Johansson L, Low DE, Gan BS, Kotb M, McGeer A, Norrby-Teglund A.** 2006. Viable Group A *Streptococci* in Macrophages during Acute Soft Tissue Infection. *PLoS Med.* **3**:e53
86. **Timmer AM, Kristian SA, Datta V, Jeng A, Gillen CM, Walker MJ, Beall B, Nizet V.** 2006. Serum opacity factor promotes group A streptococcal epithelial cell invasion and virulence. *Mol Microbiol.* **62**:15-25.

Literaturverzeichnis

87. **Tyrrell GJ, Lovgren M, Forwick B, Hoe NP, Musser JM, Talbot JA.** 2002. M types of group a streptococcal isolates submitted to the National Centre for Streptococcus (Canada) from 1993 to 1999. *J Clin Microbiol.* **40**:4466-71.
88. **Tyrrell GJ, Lovgren M, Kress B, Grimsrud K.** 2005. Invasive group A streptococcal disease in Alberta, Canada (2000 to 2002). *J Clin Microbiol.* **43**:1678-83.
89. **Unnikrishan, M., Cohen, J., and Sriskandan, S.** 1999. Growth-phase-dependent expression of virulence factors in an M1T1 clinical isolate of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **67**:5495-5499.
90. **Valentin-Weigand P, Benkel P, Rohde M, Chhatwal GS.** 1996. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. *Infect Immun.* **64**:2467-73.
91. **van Furth R, Beekhuizen H.** 1998. Monocytes. In: Delves PJ, Roitt IM (Hrsg.). *Encyclopedia of Immunology*. Bd. 3. 2. Aufl. London, New York, Tokyo: Academic Press
92. **Verhoef J.** 1998. Phagocytosis. In: Delves PJ, Roitt IM (Hrsg.). *Encyclopedia of Immunology*. Bd. 3. 2. Aufl. London, New York, Tokyo: Academic Press
93. **Vlaminckx BJ, Mascini EM, Schellekens J, Schouls LM, Paauw A, Fluit AC, Novak R, Verhoef J, Schmitz FJ.** 2003. Site-specific manifestations of invasive group a streptococcal disease: type distribution and corresponding patterns of virulence determinants. *J Clin Microbiol.* **41**:4941-9.
94. **Voyich JM, Sturdevant DE, Braughton KR, Kobayashi SD, Lei B, Virtaneva K, Dorward DW, Musser JM, DeLeo FR.** 2003. Genome-wide protective response used by group A *Streptococcus* to evade destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**:1996-2001.
95. **Wang JR, Stinson MW.** 1994. M protein mediates streptococcal adhesion to HEp-2 cells. *Infect Immun.* **62**:442-8

Literaturverzeichnis

96. **Wexler DE, Chenoweth DE, Cleary PP.** 1985. Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator. Proc Natl Acad Sci U S A. **82**:8144-8.
97. **Whitnack E, Beachey EH.** 1985. Inhibition of complement-mediated opsonization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* by D fragments of fibrinogen and fibrin bound to cell surface M protein. J Exp Med. **162**:1983-97.
98. **Zhao G, Feng X, Na A, Yongqiang J, Cai Q, Kong J, Ma H.** 2005. Acute guttate psoriasis patients have positive streptococcus hemolyticus throat cultures and elevated antistreptococcal M6 protein titers. J Dermatol. **32**:91-6.
99. **Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmuller G.** 1988. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. Int J Cancer. **41**:456-61.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

APSGN	akute Post-Streptokokken-Glomerulonephritis
Aqua dest.	aqua destillata (destilliertes Wasser)
ARF	akutes rheumatisches Fieber
BALB/c-Maus	Bagg Albino-Maus (durch Inzucht erzeugter Albino-Mausstamm)
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CFU	colony forming units (Kolonie-bildende Einheiten)
Cpa	kollagenbindendes Protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIF	Doppelimmunfluoreszenz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
<i>emm</i>	für das M-Protein codierendes Gen
et al.	et alii (und andere)
Fas	Fibronectin-/Fibrinogen-bindender, hämolytisch aktiver, Streptokinase-Regulator
FasBCAX	Regulator-System für die Expression von Virulenzfaktoren von Streptokokken
Fba	Fibronectin-bindendes Protein der Streptokokken
FBP54	fibronectinbindendes Protein 54
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung

Anhang

GAS	Gruppe A-Streptokokken
GBS	Gruppe-B-Streptokokken
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor)
h	Stunde
HeLa- Zellen	Henrietta Lacks- Zellen (Zelllinie aus Zervix-Carcinom-Zellen)
HEp2-Zellen	Zelllinie aus humanen Larynxkarzinom-Zellen
HLA	Human Leukocyte Antigen (humanes Leukozytenantigen)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Zelllinie aus humanen Endothelzellen aus der Umbilikalvene)
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
J774	murine Makrophagen-Zelllinie
kDa	Kilodalton
Lsp	Lipoprotein of <i>S. pyogenes</i>
LTA	Lipoteichonsäure
M	Molar
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minuten
mind.	mindestens
ml	Milliliter
MM6	Monozytenzelllinie Mono Mac 6
Mrp	M-related protein
MUMPs	murine mikrobizide Proteine
Mx	M-Protein-Serotyp x
NEAA	nichtessentielle Aminosäuren

Anhang

Nra	negative regulator of group A streptococci
o.g.	oben genannte/r/s
ODx	optische Dichte bei einem Wert von x nm
p.i.	post infectionem
PBS	Phosphat Buffered Saline
PMN	polymorphkernige Granulozyten
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro min)
RPMI	nach dem Roswell Park Memorial Institute benanntes Zellkulturmedium
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>sagA</i>	für Agressine codierendes GAS-Gen
ScpC	streptococcal chemokine protease
<i>Ska</i>	Streptokinase
SLO	Streptolysin O
SLS	Streptolysin S
SOF	Serumopazitätsfaktor
speB	streptokokkales pyrogenes Exotoxin B
Stabw.	Standardabweichung
STSS	Streptokokken-assoziiertes toxisches Schock- Syndrom
THB	Todd-Hewitt-Bouillon
THY	Todd-Hewitt-Yeast (Medium)
TLR	Toll like Receptors
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
u.a.	unter anderem
U	Unit
ÜNK	Übernachtkultur
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

Es gelten weiterhin die allgemeinen SI-Einheiten sowie die chemischen Elementsymbole.

7.2 **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abbildung 1: Aufbau des Fas-Regulon	11
Abbildung 2: Wachstumsreihe J774	37
Abbildung 3: Phagozytoseassay J774	38
Abbildung 4: Adhärenz und Internalisierung verschiedener A-Streptokokken-Serotypen an J774 im CFU-Assay	39
Abbildung 5: Doppelimmunfluoreszenz	42
Abbildung 6: Internalisierung der untersuchten Streptokokken-Serotypen an J774 in der Doppelimmunfluoreszenz	43
Abbildung 7: Transiente Bakterien in der Doppelimmunfluoreszenz	44
Abbildung 8: Adhärenz der untersuchten Streptokokken-Serotypen an J774 in der Doppelimmunfluoreszenz	45
Abbildung 9: Doppelimmunfluoreszenz – Fotos der Stämme M49 und Δ <i>fasX</i>	46
Abbildung 10: Adhärenz und Internalisierung der GAS-Serotypen bei J774 gestapelt	47
Abbildung 11: Prozentuale Anteile der sich als tot, lebend bzw. gemischt tot und lebenden darstellenden Bakterienketten J774	48
Abbildung 12: Wachstumsreihe MM6	49
Abbildung 13: Phagozytoseassay MM6	50
Abbildung 14: Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von Penicillin und Streptomycin auf die Zahl der Streptokokken	51
Abbildung 15: Internalisierung verschiedener Gruppe-A-Streptokokken in MM6 im CFU-Assay	52
Abbildung 16: Internalisierung der untersuchten Streptokokken-Serotypen in MM6 in der Doppelimmunfluoreszenz	54
Abbildung 17: Prozentuale Anteile der sich als tot, lebend bzw. gemischt tot und lebenden darstellenden Bakterienketten MM6	55
Abbildung 18: Lebend/Tot-Färbung MM6	56
Abbildung 19: Versuch der Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen mittels Phorbol ester.....	57

Anhang

Tabelle 1: Entwicklung der Zahl der lebenden und toten eukaryoten J774 41

Tabelle 2: Entwicklung der Zahl der lebenden und toten eukaryoten MM6 53

7.3 Thesen zur Dissertation

***In vitro*- Analysen des Adhärenz- und Internalisierungsverhaltens von Gruppe-A-Streptokokken an murine Makrophagen und humane Monozyten**

These 1:

Gruppe-A-Streptokokken (GAS) galten bis vor wenigen Jahren als ausschließlich extrazelluläre Bakterien. Forschungen zeigten jedoch, dass GAS in der Lage sind, in Epithelzellen einzudringen und längere Zeit in ihnen zu überleben.

These 2:

Seit den 80er Jahren nimmt die Inzidenz der schwer verlaufenden systemischen Streptokokkenerkrankungen auffallend zu. Von anderen Bakterienspezies ist bereits bekannt, dass sie die Invasion von phagozytierenden Zellen zur Dissemination im Wirt nutzen.

These 3:

In der vorliegenden Arbeit sollte beantwortet werden, ob die Invasion von Phagozyten eine Rolle im Infektionsprozess der GAS spielt und so die Inzidenzzunahme der schwer verlaufenden Erkrankungen zu erklären sei. Weiterhin sollte der Einfluß des FasBCAX-Systems, eines Regulatorsystems für Virulenzfaktoren, auf die Invasion von Immunzellen beleuchtet werden.

These 4:

Es wurden sechs Stämme von *S. pyogenes* ausgewählt. Die fünf untersuchten GAS-Wildtypen wurden im Hinblick auf Häufigkeit und typischerweise durch diese Serotypen ausgelöste Krankheitsbilder ausgewählt. Zusätzlich wurde das Verhalten einer Mutante von Serotyp M49 untersucht, in der das FasBCAX-System durch Deletionsmutagenese ausgeschaltet wurde. Die Δ *fasX*-Mutante zeigte eine verminderte Expression sowohl von extrazellulären

Anhang

matrixproteinbindenden Adhäsinen als auch sezernierten Virulenzfaktoren (z.B. Streptokinase und Streptolysin S).

These 5:

Da GAS ausschließlich humanpathogene Bakterien sind, wurde neben der Maus-Makrophagen-Zelllinie J774 die humane Monozyten-Zelllinie Mono Mac 6 (MM6) untersucht.

These 6:

Das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten der Bakterien an die Zelllinien wurde mit 2 unterschiedlichen Methoden untersucht. Das CFU-Assay weist die teilungsfähigen Bakterien nach, die in der Lage sind, über Nacht Bakterienkolonien zu bilden. Mit der Doppelimmunfluoreszenz werden die Hüllen der Gruppe-A-Streptokokken angefärbt. Mit dieser Methode können zu allen Zeitpunkten adhärierte und intrazellulär befindliche Bakterien bestimmt werden. Eine Aussage über die Vitalität der Bakterien ist aber nicht möglich.

These 7:

In den durchgeführten Versuchen konnten die GAS nicht längere Zeit in den Phagozyten überleben. Es ließen sich aber serotypspezifische Unterschiede feststellen. Die mit schwer verlaufenden Infektionen assoziierten Serotypen M1 und M3 wurden mittels Doppelimmunfluoreszenz vermehrt intrazellulär nachgewiesen und zeigten im CFU-Assay eine erhöhte intrazelluläre Vitalität gegenüber den anderen Serotypen. Dies könnte ein Grund für die Assoziation dieser Serotypen mit systemischen GAS-Erkrankungen sein.

These 8:

Die Aufnahme der Bakterien in die Immunzellen ist in den hier durchgeführten Experimenten ein Ausdruck der Unfähigkeit der Bakterien, die Phagozytose und konsekutive Eliminierung zu verhindern. Je nach Eigenschaften des untersuchten GAS-Stamms und des infizierten Organismus kann die Invasion auch zu

Anhang

asymptomatischer Trägerschaft und Persistenz im Wirt oder invasiver Ausbreitung im Gewebe und systemischer Erkrankung führen.

These 9:

Die Δ *fasX*-Mutante wurde in geringerer Zahl intrazellulär sowie an die eukaryoten Zellen adhäriert vorgefunden als der Wildtyp M49. Daraus kann geschlossen werden, dass das Fas-Operon an der Hochregulierung von Adhäsinen beteiligt ist. Zugleich wird die Δ *fasX*-Mutante scheinbar weniger von den Phagozyten abgetötet. Der Fas-Regulator bewirkt bei seiner Aktivierung eine erhöhte Aggressivität der GAS. Dementsprechend stellt das herunterregulierte Fas-System einen Selektionsvorteil für Gruppe-A-Streptokokken dar.

These 10:

In Zukunft wäre interessant, die Interaktion von frisch isolierten, humanen Immunzellen und GAS zu studieren, da hierdurch mehr Rückschlüsse über den Ablauf *in vivo* gezogen werden könnten.

These 11:

Langfristig können durch Erforschung der Pathomechanismen der systemischen Streptokokken-Erkrankungen neue Therapieansätze für die immer noch mit einer hohen Mortalität belasteten Krankheitsbilder aufgezeigt werden.

7.4 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die beiliegende Promotionsarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen nicht benutzt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die Arbeit wurde anderweitig noch nicht als Dissertation eingereicht. Die dem angestrebten Promotionsverfahren zu Grunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Halle, den 17.09.2008

Bianka Skupin

7.5 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Professor Podbielski für die Bereitstellung des Themas danken. Ganz besonderer Dank gilt Bernd Kreikemeyer für seine Geduld und Mühe, die er über lange Zeit bei der Betreuung dieser Arbeit aufgebracht hat. Ein Dank geht auch an Michael Klenk und Gabriele Beyer-Sehlmeyer, die mir immer mit einem guten Rat zur Seite standen.

Für die vielen Erklärungen bei der täglichen Arbeit im Labor möchte ich allen Mitarbeitern des Forschungslabors besonders danken.